

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



CONDIÇÕES HÍGIO-SANITÁRIAS DE ALGUNS ESTABELECIMENTOS DE RESTAURAÇÃO E
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS NELES PRODUZIDOS

SUSANA SIMÕES GAMEIRO

ORIENTADORA:

Mestre Catarina Freire de Novais Santos
Tiago

COORIENTADORA:

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres
Ferreira

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



CONDIÇÕES HÍGIO-SANITÁRIAS DE ALGUNS ESTABELECIMENTOS DE RESTAURAÇÃO E
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS NELES PRODUZIDOS

SUSANA SIMÕES GAMEIRO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutor António Salvador Ferreira
Henriques Barreto

VOGAIS:

Doutora Ana Rita Barroso Cunha de Sá
Henriques

Mestre Catarina Freire de Novais Santos
Tiago

ORIENTADORA:

Mestre Catarina Freire de Novais Santos
Tiago

COORIENTADORA:

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres
Ferreira

2021

DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Nome: Susana Simões Gameiro

Título da Tese ou
Dissertação: Condições higio sanitárias de alguns estabelecimentos de restauração e
qualidade microbiológica de alimentos neles produzidos

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas
públicas): 2021

Designação do curso
de Mestrado ou de
Doutoramento: Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- ☐ Clínica ☒ Produção Animal e Segurança Alimentar
☐ Morfologia e Função ☐ Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

1. ☒ Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
2. ☐ Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de ☐ 6 meses, ☐ 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

1. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
2. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
3. DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 28 de Maio de 2021

Assinatura: Susana Simões Gameiro

Agradecimentos

Um obrigado muito especial à minha co-orientadora, Professora Doutora Marília Ferreira, e à minha orientadora, Dra Catarina Tiago por, apesar do longo período de tempo entre o estágio e a redação da dissertação, sempre tiveram disponibilidade para me ajudarem.

À Professora Doutora Marília Ferreira por ter aceitado co-orientar esta dissertação, pela ajuda preciosa na escolha do orientador científico, pelos incentivos, paciência e por todo o apoio e disponibilidade.

À Dra Catarina Tiago pela pessoa excecional que é, pela total disponibilidade em partilhar comigo os seus conhecimentos e experiência profissional, pelo enorme apoio e, acima de tudo, pela amizade.

À Lena e à Maria José, técnicas do Laboratório de Segurança Alimentar da FMV/ULisboa pela ajuda, simpatia e disponibilidade.

À Catarina pela ajuda e à Joana por me ter orientado no Laboratório de Microbiologia Alimentar, muito obrigado por tudo.

Aos amigos que tive a sorte de fazer durante o meu percurso pela FMV, obrigado pelo vosso carinho e amizade. Às minhas amigas, que me acompanham quase desde que nasci, muito obrigado pela vossa amizade, por toda a força e apoio que me deram durante a fase mais complicada da minha vida.

Aos meus pais, irmão e cunhada por sempre me terem apoiado incondicionalmente nesta trajetória. Um muito obrigado à minha mãe por ser a mulher que é e por nunca ter desistido de mim, mesmo nos tempos mais sombrios.

A todos Muito Obrigado!

Condições hígio-sanitárias de alguns estabelecimentos de restauração e qualidade microbiológica de alimentos neles produzidos

Resumo

Na última década, tem-se observado mudanças nos hábitos alimentares da população mundial devido ao modo de vida contemporâneo, com tendência crescente para o consumo de alimentos prontos a consumir em estabelecimentos de restauração. É igualmente crescente a preocupação com a segurança dos alimentos produzidos nestes estabelecimentos.

As doenças transmitidas por alimentos são originadas pela ingestão de água ou alimentos contaminados com agentes químicos, físicos ou biológicos, sendo a contaminação por microrganismos a causa mais frequente. Os microrganismos contaminantes são agrupados em dois grupos: os que afetam a qualidade alimentar e os patogénicos. As doenças de origem alimentar são conhecidas por contribuírem para a morbilidade e mortalidade humana, aumentando assim as perdas económicas e os custos dos cuidados de saúde. Têm sido alvo de pesquisas e identificação de agentes etiológicos e fatores correlacionados, como a avaliação do risco microbiológico. O conhecimento dos fatores envolvidos no processo é importante para estabelecer os mecanismos de prevenção e controlo. A segurança dos alimentos produzidos é assegurada pela implementação e aplicação de medidas preventivas tais como as Boas Práticas de Fabrico e de Higiene e planos de autocontrolo baseados no sistema HACCP.

A literatura associada ao crescimento e sobrevivência de bactérias patogénicas em alimentos prontos para consumo na restauração é escassa. O presente trabalho teve como principal objetivo caracterizar estabelecimentos de restauração relativamente às suas condições sanitárias e de produção e quanto à segurança e qualidade dos alimentos neles produzidos. A avaliação das suas condições higiénicas e de produção foi realizada com base numa lista de verificação e posterior recolha de amostra do prato do dia para análise microbiológica.

Constatou-se que a probabilidade de sobrevivência e crescimento de bactérias patogénicas nos alimentos prontos para consumo estudados é muito baixa, pois não foi detetada a sua presença. Por conseguinte, desde que os cuidados de higiene pessoal e ambiental sejam apropriados, assim como as condições do binómio tempo-temperatura sejam adequadas durante as etapas de produção e armazenamento, os perigos para a saúde do consumidor podem ser eliminados ou reduzidos para níveis aceitáveis.

Palavras chave: Doenças transmitidas por alimentos, Segurança dos alimentos, Boas Práticas de Fabrico e de Higiene, HACCP, Microrganismos indicadores de higiene.

Hygienic-sanitary conditions of some restaurants and microbiological quality regarding their food produced

Abstract

In the last decade, modern lifestyle changed the food habits of the world population with an increasing trend towards the consumption of ready-to-eat foods in restaurants. It is also growing the concern with safety of food produced in these establishments.

Foodborne illnesses are caused by ingestion of water or food contaminated with chemical, physical or biological agents, the contamination per microorganisms is the most frequent cause. Contaminating microorganisms are grouped into two groups: those that affect food quality and pathogens. Foodborne illnesses contribute to human morbidity and mortality, consequently increasing economic losses and health care costs. These diseases have been researched for identification of etiological agents and correlated factors, like Microbiological Risk Assessment. The prevention and control mechanisms implementation requires the knowledge of factors involved in foodborne illnesses. Food Safety is ensured by the implementation and application of preventive measures such as Good Manufacturing and Hygiene Practices and self-control plans based on HACCP system.

Data concerning the pathogenic bacteria growth and survival in ready-to-eat foods served in restaurants are scarce. In the present work the main goal was to characterize restaurants regarding sanitary and production conditions and to analyze ready-to-eat food safety and quality. The conditions evaluation was conducted based on a checklist and with subsequent sample collection of the ready-to-eat food for microbiological analysis.

It was verified that the probability of survival and growth of pathogenic bacteria in the studied ready-to-eat foods is very low, since their presence was not detected. Therefore, as long the personal and environmental hygiene and the time-temperature binomial conditions are appropriate during the production and storage, the health hazards to consumer can be eliminated or reduced to acceptable levels.

Key-words: Foodborne diseases, Food Safety, Good Manufacturing and Hygiene Practices, HACCP, hygiene indicator microorganisms.

Relatório de estágio curricular

As empresas do setor alimentar necessitam de ter Sistemas de Segurança Alimentar (SSA) capazes de fazer face às necessidades do mercado, às imposições legais, e de satisfazer as expectativas dos consumidores. Assim, surge o sistema HACCP que é um SSA concebido para prevenir a ocorrência de perigos nos alimentos, controlando os riscos de forma preventiva.

O meu estágio curricular, que decorreu no período de 6 de Outubro de 2010 a Fevereiro de 2011, constituiu a base para a elaboração da presente dissertação para alcançar o grau de Mestre em Medicina Veterinária, pertencendo à área científica da Segurança Alimentar e teve por tema “Consultoria em Higiene e Segurança Alimentar”.

De uma forma geral adquiri novos conhecimentos e técnicas e aprofundei os previamente adquiridos nos anos curriculares de Medicina Veterinária na área da Segurança Alimentar.

O estágio ocorreu na empresa Plano Consultores, uma empresa de consultoria na área de Segurança Alimentar, sob orientação da Mestre Catarina Tiago. Uma parte do estágio foi passada na sede da empresa, em Lisboa, dedicada à organização das pastas relativas ao SSA de diferentes unidades, procedendo-se sempre que possível à solicitação da documentação que pudesse estar em falta.

Por outro lado, verificou-se *in loco* o cumprimento do programa de pré-requisitos do sistema HACCP implementado nos operadores, por exemplo, através do controlo de temperatura dos equipamentos de frio, monitorização das condições higio-sanitárias do estabelecimento, e verificação da eficácia do programa de controlo de pragas implementado. Posteriormente fez-se a análise microbiológica de amostras de mãos dos manipuladores, superfícies e de produtos finais. Nos estabelecimentos visitados organizaram-se os dossiers do SSA com a documentação legalmente exigida, como por exemplo, as fichas de aptidão médica dos colaboradores e as fichas técnicas e de dados de segurança dos produtos de limpeza e desinfeção e dos produtos usados no controlo de pragas.

O estágio consistiu em visitas a estabelecimentos de restauração e bebidas, só de bebidas, uma fábrica de panificação e uma empresa de fabrico de leitão assado (composta por uma unidade de fabrico com venda ao público e dois restaurantes). A realização de auditorias internas permite fazer a avaliação do SSA implementado, com vista à identificação de falhas potenciais e introdução das correções necessárias.

As visitas efetuadas aos estabelecimentos tinham vários componentes, nomeadamente avaliar o seu estado sanitário essencialmente por inspeção visual, e se necessário transmitir informação pertinente em matéria de boas práticas de higiene aos manipuladores de alimentos (também designada por formação *on the job*). Os funcionários eram sensibilizados para a importância de uma adequada higienização das instalações,

equipamentos e utensílios, assim como para a importância de uma higiene pessoal adequada, ou outras boas práticas de higiene. As principais não conformidades detetadas e respetivas correções eram expressas no relatório de auditoria. A auditoria interna foi feita com recurso ao uso de uma lista de verificação da empresa, a qual obedecia às disposições legais em matéria de higiene alimentar. Posteriormente era elaborado o relatório da auditoria, com as correspondentes sugestões, e aconselhamento para algumas melhorias possíveis. Também ocorreram ações de formação *in loco* para os manipuladores de alimentos, abrangendo vários temas como microbiologia, higiene pessoal, higiene das instalações, equipamentos e utensílios e higiene da produção (da receção ao produto final) com o objetivo de obter um alimento seguro e de qualidade.

Na sede da empresa realizaram-se os relatórios das auditorias efetuadas com base na lista de verificação, a programação junto do laboratório responsável pelo controlo analítico a vários elementos como géneros alimentícios, superfícies e mãos de manipuladores, além de instruções de trabalho e modelos de registos vários como de controlo de temperaturas, óleos de fritura, operações de higienização, entre outros necessários para o controlo dos pré-requisitos.

O objetivo da consultoria é avaliar se os SSA implementados garantem a inocuidade dos géneros alimentícios, e apontar as correções necessárias ao sistema. Com o recurso à lista de verificação da empresa consultora faz-se a recolha de amostras dos géneros alimentícios confeccionados para validar o SSA (obter um alimento seguro). Uma parte do meu trabalho consistiu na construção de uma lista de verificação para avaliar os estabelecimentos selecionados.

As auditorias internas aos SSA realizam-se por decisão das organizações (públicas e privadas) e servem para fazer a avaliação do sistema com vista à identificação de falhas potenciais e correções necessárias. É necessário que os auditores (internos ou externos) conheçam o sistema em causa. Deve-se proceder a um estudo prévio do SSA presente nos estabelecimentos de restauração e bebidas, como ao estudo da legislação em vigor aplicada ao setor da restauração e bebidas.

A minha dissertação é composta por duas partes - a relativa à auditoria, e outra relativa ao trabalho laboratorial, com base nas atividades desenvolvidas entre Janeiro e Fevereiro de 2011, para além de continuar a acompanhar a Mestre Catarina Tiago no seu trabalho. Para a minha dissertação visitámos 15 estabelecimentos de restauração e bebidas, entre as 14h e as 16 horas, dos quais apenas três eram acompanhados por uma empresa de consultoria. Para o apoio da auditoria foi realizada uma lista de verificação baseada nas listas da empresa Plano Consultores, e, no fim da visita era feita a recolha de amostras, do prato do dia elaborado para o almoço desse dia, de acordo com o procedimento de colheita de amostras de refeições prontas a consumir para análise microbiológica (INSA [date unknown]). O objetivo

do trabalho foi verificar se os resultados obtidos das análises microbiológicas efetuadas eram muito diferentes nas empresas com um SSA implementado e naquelas que não o tinham e avaliar se o período de manutenção à temperatura ambiente permitia de facto um aumento dos valores microbiológicos.

Nas unidades alimentares deve-se tentar garantir que os SSA implementados garantem a inocuidade dos alimentos, deve-se verificar se os requisitos da legislação vigente são aplicados e fazer as correções necessárias ao sistema.

Um dos objetivos da restauração será, certamente, servir uma refeição equilibrada do ponto de vista nutricional, segura e que vá ao encontro das exigências e expectativas dos consumidores. A sua finalidade é produzir um alimento com qualidade gastronómica e higio-sanitária, e para tal deve ser garantida a inocuidade, salubridade e conservação em boas condições dos produtos alimentares desde a receção das matérias-primas até à sua distribuição. Ainda que, não obstante, se pretenda igualmente obter a maior margem de lucro possível.

Lista de abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ANCIPA	Associação Nacional de Comerciantes e Industriais de Produtos Alimentares
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARM	Avaliação de Risco Microbiológico
a_w	Atividade da água
BPH	Boas Práticas de Higiene
BPF	Boas Práticas de Fabrico
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CFSAN	<i>Center for Food Safety and Applied Nutrition</i>
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
Eh	Potencial oxidação-redução
EM	Estados Membros
EPI	Equipamento de Proteção Individual
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FSAI	<i>Food Safety Authority of Ireland</i>
H ₂ S	Ácido sulfídrico
HACCP	<i>Hazard Analysis and Critical Control Points</i>
ICMSF	<i>International Commission on Microbiological Specifications for Foods</i>
INSA	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
ml	Mililitro
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanometro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PCC	Ponto de Controlo Crítico
pH	Potencial Hidrogeniónico
SSA	Sistema de Segurança Alimentar
ufcs	Unidades formadoras de colónias
WHO	<i>World Health Organization</i>
µl	Microlitro

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	ix

I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 1

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR	2
2.1.	<i>Perigos alimentares</i>	3
2.2.	<i>Principais agentes biológicos transmitidos pelos alimentos</i>	4
2.3.	<i>Dose infetante</i>	6
2.4.	<i>Incidência e notificação de toxinfecções alimentares na EU</i>	7
2.5.	<i>Bactérias patogénicas</i>	8
2.5.1.	Salmonella spp.....	8
2.5.2.	Escherichia coli O157:H7.....	9
2.5.3.	Listeria monocytogenes	10
2.6.	<i>Fatores que afetam o crescimento bacteriano</i>	11
2.6.1.	Fatores intrínsecos	11
2.6.1.1.	Atividade da água	12
2.6.1.2.	pH.....	12
2.6.1.3.	Disponibilidade de nutrientes	12
2.6.1.4.	Potencial oxidação-redução (Eh).....	13
2.6.1.5.	Estrutura física do alimento e mecanismos antimicrobianos.....	13
2.6.2.	Fatores extrínsecos	14
2.6.2.1.	Temperatura	14
2.6.2.2.	Humidade relativa	15
2.6.2.3.	Composição da atmosfera.....	15
2.7.	<i>Fatores que contribuem para doença alimentar</i>	16
2.7.1.	Matérias-primas contaminadas.....	16
2.7.2.	Manipulações inadequadas que originam contaminações cruzadas	17
2.7.3.	Área/zona de receção	17
2.7.4.	Armazenamento à temperatura ambiente (10°C a 21°C)	18
2.7.5.	Armazenamento a baixas temperaturas.....	18
2.7.6.	Práticas incorretas de descongelação	19
2.7.7.	Confeção inadequada	19
2.7.8.	Arrefecimento impróprio.....	21
2.7.9.	Manter a quente e reaquecimento.....	21
2.7.10.	Outros fatores.....	22
3.	ESTRATÉGIAS DE PREVENÇÃO E CONTROLO.....	22
3.1.	<i>Boas Práticas de Fabrico</i>	22
3.1.1.	Manipuladores de alimentos	22
3.1.1.1.	Higiene pessoal.....	23
3.1.1.2.	Formação	23
3.2.	<i>Análise de Perigos e Pontos de Controlo Críticos (HACCP)</i>	24
4.	MICROORGANISMOS INDICADORES DE QUALIDADE ALIMENTAR	28
4.1.	<i>Microrganismos aeróbios mesófilos a 30°C</i>	29
4.2.	<i>Enterobacteriaceae</i>	30
4.3.	<i>Outros microrganismos indicadores</i>	31

4.3.1.	Coliformes totais	31
4.3.2.	Coliformes fecais e <i>Escherichia coli</i>	31
II. MATERIAL E MÉTODOS		32
1.	INTRODUÇÃO.....	32
2.	REALIZAÇÃO DA LISTA DE VERIFICAÇÃO	32
3.	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DOS ALIMENTOS	34
3.1.	<i>Avaliação da qualidade microbiológica e segurança</i>	34
3.1.1.	Amostragem	34
3.1.2.	Preparação de amostra para análise microbiológica e diluições decimais seriadas (ISO 6887 – 2: 2017)	35
3.1.3.	Contagem de microrganismos	36
3.1.3.1.	Contagem de aeróbios mesófilos a 30°C (NP 4405: 2002).....	36
3.1.3.2.	Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> (ISO 21528-2: 2004).....	36
3.1.3.3.	Contagem de <i>Escherichia coli</i> (NP 4396:2002).....	36
3.1.4.	Pesquisa de microrganismos	36
3.1.4.1.	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. (ISO 6579-1:2002)	36
3.1.4.2.	Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> (ISO/DIS 11290-1, 1996).....	37
3.2.	<i>Avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos prontos para consumo</i>	38
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO		43
1.	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	43
1.1.	<i>Caracterização dos estabelecimentos de restauração</i>	43
1.2.	<i>Práticas de fabrico e armazenamento</i>	44
1.3.	<i>Instalações</i>	47
1.4.	<i>Controlo de processos</i>	49
1.5.	<i>Higiene pessoal</i>	51
1.6.	<i>HACCP</i>	53
1.7.	<i>Determinações microbiológicas</i>	55
IV. CONCLUSÃO		64
V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		66

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 – Caracterização quanto ao risco e difusão dos perigos biológicos.....	5
TABELA 2 – Doses infetantes de alguns microrganismos patogénicos.....	7
TABELA 3 – Classificação dos microrganismos quanto à sua temperatura ótima de crescimento	14
TABELA 4 – Fatores que afetam o crescimento bacteriano nos alimentos.....	16
TABELA 5 – Lista de verificação utilizada na auditoria.....	33
TABELA 6 – “Valores-guia INSA” – Grupo 1 e Subgrupos de alimentos prontos para consumo....	38
TABELA 7 – “Valores-guia INSA” – Grupo 2 e Subgrupos de alimentos prontos para consumo...	39
TABELA 8 – “Valores-guia INSA” – interpretação da qualidade microbiológica.....	40
TABELA 9 – “valores-guia INSA” – microrganismos indicadores de higiene e de alteração, e patogénicos em alimentos prontos para consumo.....	41
TABELA 10 – Estabelecimentos de restauração, classificação em grupos e subgrupos de acordo com INSA (2019) e correspondentes pratos do dia.....	55
TABELA 11 – Resultados das determinações microbiológicas dos indicadores de higiene dos géneros alimentícios e classificação dos restaurantes.....	56
TABELA 12 – Classificação das amostras quanto à contagem de microrganismos indicadores em placa.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 – Diferenciação de perigos não significativos e significativos, e decisão sobre o respectivo controlo, através de pré-requisitos ou do plano HACCP	25
FIGURA 2 – A imagem da esquerda corresponde a uma placa de petri com ufc de aeróbios mesófilos e, a imagem da direita corresponde a ufc de <i>Enterobacteriaceae</i>	57
FIGURA 3 – A placa de Petri da esquerda corresponde a uma placa com ufc em meio Hektoen e a da direita com meio XLD. As amostras L e M, cada uma, numa hemi-placa.....	60
FIGURA 4 – Tubo com meio TSI (à esquerda) e tubo com meio TSI após sementeira e incubação (à direita).....	60
FIGURA 5 – Teste API® 20E (BIOMÉRIEUX) com os resultados bioquímicos para a espécie <i>Proteus mirabilis</i>	61
FIGURA 6 – A imagem da esquerda corresponde a uma placa de petri com meio Oxford com colónias suspeitas de <i>L. monocytogenes</i> , e a imagem da direita corresponde a uma placa com meio TSA com colónias azuis características	61
FIGURA 7 – Teste API® <i>Listeria monocytogenes</i> (BIOMÉRIEUX) com os resultados das provas bioquímicas para a espécie <i>Listeria seeligeri/welshimeri</i>	62

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – Número de funcionários por valores percentuais de estabelecimentos.....	44
GRÁFICO – Pontuação atribuída a cada estabelecimento de restauração.....	45
GRÁFICO 3 – Valores percentuais referentes às questões: existem zonas de preparação separadas por tipo de produto (15), zona de manipulação de confeccionados separada (16) e higiene das instalações e utensílios adequada (17).....	48
GRÁFICO 4 – Pontuação atribuída a cada estabelecimento de restauração referente às instalações.....	49
GRÁFICO 5 – Controlos referentes ao controlo de fornecedores, receção e armazenamento de matérias-primas.....	50
GRÁFICO 6 – Classificações dos estabelecimentos de restauração relativas ao controlo de processos.....	51
GRÁFICO 7 – Classificações dos estabelecimentos de restauração relativas à higiene pessoal.....	52
GRÁFICO 8 – Classificações dos estabelecimentos de restauração relativas ao plano de autocontrolo baseado nos princípios HACCP.....	53
GRÁFICO 9 – Pontuação Global dos restaurantes.....	54

I. Revisão bibliográfica

1. Introdução

O modo de vida contemporâneo derivado do crescimento económico e da globalização está a provocar mudanças nos hábitos culturais da população, inclusive alimentares. Hoje temos ao nosso dispor uma grande variedade de alimentos, ao longo do ano, muitos dos quais percorreram muitos quilómetros para que lhes tivéssemos acesso. A diminuição do tempo disponível para a preparação dos alimentos leva grande parte da população a optar por refeições mais rápidas e variadas, de fácil aquisição e preparação, e também pela realização de refeições fora do domicílio, aumentando a procura por serviços de alimentação coletiva (Chouman et al. 2010).

No Regulamento n.º 2073/2005 da Comissão Europeia, de 15 de Novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, os alimentos prontos para consumo são “alimentos destinados pelo produtor ou fabricante ao consumo humano direto, sem necessidade de cozedura ou outra transformação, eficazes para eliminar ou reduzir para um nível aceitável os microrganismos perigosos”.

Considerando os vários aspetos inerentes ao aumento da procura pelos serviços de refeição fora de casa, a qualidade sanitária dos alimentos é uma questão fundamental, tendo em conta a amplitude do público atendido. A elaboração de alimentos com padrões higiénicos satisfatórios é uma das condições essenciais para a promoção e prevenção da saúde, e o inadequado controlo destas condições é um dos fatores responsáveis pela ocorrência dos surtos de doenças de origem alimentar (Neto and Rosa 2014).

De acordo com o *Codex Alimentarius* (FAO and WHO 2003), a segurança dos alimentos pressupõe a garantia de que os alimentos não provocarão danos ao consumidor, desde que sejam consumidos de acordo com a utilização prevista, estando intrinsecamente ligada à higiene dos géneros alimentícios.

As doenças transmitidas por alimentos ocorrem pela ingestão de água ou alimentos contaminados com agentes químicos, físicos ou biológicos, sendo a contaminação de alimentos por agentes biológicos, através de microrganismos, a causa mais frequente. A contaminação de alimentos com águas contaminadas também deve ser considerada pois poderão estar presentes microrganismos patogénicos. Sabe-se que alimentos preparados em larga escala estão, cada vez mais, envolvidos em casos de surtos de doença de origem alimentar, frequentemente associados à contaminação microbiana (Lima et al. 2015).

As doenças de origem alimentar são conhecidas por contribuírem para a morbilidade e mortalidade humana, bem como para o aumento do custo dos cuidados de saúde (Neto and Rosa 2014). Para minimizar o acesso de microrganismos aos alimentos, a qualidade microbiológica do ambiente ao qual um alimento é exposto (superfícies de contacto com

alimentos e manipuladores) e os ingredientes que são adicionados ao alimento devem ser de boa qualidade microbiológica (Souza et al.1983).

O controlo e segurança da qualidade dos alimentos tem sido um dos grandes desafios colocados à indústria alimentar, quer pela legislação existente, quer pelos consumidores, cada vez mais informados e exigentes. A qualidade e segurança alimentar tem sido objeto de uma constante evolução, com vista à oferta de produtos seguros ao consumidor. De entre os vários parâmetros com influência na inocuidade dos alimentos, as suas características microbiológicas assumem particular relevância, quer pelas doenças que podem provocar quer pela estabilidade do alimento com manutenção das suas qualidades, durante o período de vida útil. A análise microbiológica de alimentos é assim uma importante vertente a ter em consideração em qualquer sistema que tenha como intenção a garantia da higiene e segurança alimentar (André 2017).

2. Doenças de origem alimentar

Os perigos alimentares têm sido identificados, ao longo da história, como um problema para a saúde do Homem e muitos dos atuais problemas de segurança alimentar são provavelmente tão antigos quanto a humanidade. Apesar dos esforços por parte das autoridades governamentais de todo o mundo para promover a melhoria da segurança da cadeia alimentar, continuam a ocorrer e são problemáticos para a saúde pública tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento (OMS 2006).

Estima-se que anualmente morram 1,8 milhões de pessoas devido a doenças diarreicas, devidas na sua maioria a alimentos ou água contaminada. São conhecidas mais de 250 doenças transmitidas por alimentos. A preparação higiénica dos alimentos pode prevenir a ocorrência da maioria dos casos (OMS 2006; Veiga et al. 2009).

Os alimentos podem servir de veículo e/ou de substrato para a multiplicação de diversos microrganismos, muitas vezes patogénicos ou capazes de produzir toxinas, podendo causar risco aos consumidores quando ingeridos (Carvalho et al. 2005).

As doenças transmitidas por alimentos acarretam sofrimento físico e gastos ao consumidor, prejuízos financeiros e morais ao estabelecimento produtor (representados por pagamento de indemnizações, eliminação de produtos, queda na produtividade, e pela repercussão sobre a sua imagem) e gastos para o setor governamental (gastos nos tratamentos de médicos e baixas) (Chouman et al. 2010).

A sintomatologia destas doenças é semelhante, caracterizando-se por diarreia, dores abdominais, vómitos e consequente desidratação, o que impossibilita a sua diferenciação exclusivamente pelos sintomas. Além disso, outras doenças não associadas a alimentos também podem apresentar os mesmos sintomas, podendo levar a diagnósticos errados (Viegas 2010).

As infecções de origem alimentar são um importante problema de saúde em todo o mundo. A epidemiologia destas infecções nos países industrializados alterou-se notavelmente nos últimos anos. Um número crescente de veículos incomuns, alimentos antes considerados seguros do ponto de vista microbiológico, tem sido associado com a infecção no Homem. Assim, a vigilância deve considerar a monitorização de populações animais saudáveis e as preocupações da saúde pública devem incluir os acontecimentos em todo o mundo (Viegas 2010).

A prevenção pode ser conseguida pela identificação e controlo de pontos-chave, desde o prado até ao prato, nos quais a contaminação pode ocorrer ou ser eliminada. A estratégia geral de prevenção mais utilizada, o sistema HACCP - *Hazard Analysis and Critical Control Points*, substituiu a estratégia em que apenas se inspecionava o produto final. A prevenção deve ser iniciada logo ao nível da produção primária, mas a educação do consumidor, acerca dos princípios básicos da segurança dos alimentos, é uma forte componente de prevenção. Uma boa parte dos casos de doenças alimentares por agentes microbiológicos tem origem no domicílio (EFSA and ECDC 2017).

O turismo é muito importante quer para países desenvolvidos quer em desenvolvimento, os quais devem melhorar os padrões de segurança e qualidade dos alimentos, no garante da saúde pública. O turismo entre os Estados Membros (EM) parece ser responsável por mais casos de doença de origem alimentar do que o turismo para fora do espaço europeu (EFSA and ECDC 2017).

2.1. Perigos alimentares

O conceito de perigo alimentar tem várias definições apresentadas por organizações de referência. O *Codex Alimentarius* (FAO and WHO 2003) define-o como “qualquer propriedade biológica, física ou química, que possa tornar um alimento prejudicial para consumo humano”. Os autores Baptista e Linhares (2005) propõem a definição de “perigo como tudo aquilo que pode estar presente num alimento, naturalmente ou não, e que pode afetar a saúde do consumidor causando-lhe lesões ou doenças”.

Os perigos são classificados segundo a sua natureza e são normalmente classificados em três categorias: biológicos, químicos e físicos (Baptista and Linhares 2005).

Os perigos biológicos: bactérias, fungos, vírus, parasitas e toxinas microbianas, são os que representam maior risco à inocuidade dos alimentos. Estes organismos estão frequentemente associados à manipulação e à utilização de matérias-primas contaminadas. Muitos ocorrem naturalmente no ambiente onde os alimentos são produzidos, alguns são destruídos por processos térmicos, e muitos podem ser controlados por práticas adequadas de manipulação e armazenamento, boas práticas de higiene e de fabrico e controlo de tempo e temperatura dos processos (Baptista and Venâncio 2003).

Os perigos químicos incluem compostos agrícolas como pesticidas, antibióticos e hormonas de crescimento; produtos de higiene como os detergentes e desinfetantes; toxinas que ocorrem naturalmente; aditivos alimentares; compostos alergénios e compostos químicos provenientes dos processos industriais que podem ser introduzidos na cadeia alimentar diretamente durante o processamento ou indiretamente por vetores como os animais e plantas (Baptista and Venâncio 2003).

O consumo prolongado de alimentos, incluindo a água para consumo, contaminados com tóxicos de origem química como os metais pesados ou dioxinas, pode resultar numa acumulação destes tóxicos, o que a médio/longo prazo pode desencadear diversas doenças do foro oncológico ou neurológico, entre outros. Estes tóxicos podem ser veiculados pela água, ar, solos ou por matérias que contactam com os alimentos (Veiga et al. 2009).

Os perigos físicos que podem ser encontrados nos géneros alimentícios têm uma natureza variada incluindo fragmentos de vidro, de metal e de madeira, fragmentos de plástico, de borracha, de panos e de esfregões de aço, pedras, areias, ossos ou seus fragmentos, espinhas, peças de bijutaria e outros objetos pessoais dos manipuladores, pragas ou frações do corpo das pragas, isótopos radioativos entre outros (Veiga et al. 2009).

Em oposição às contaminações químicas e microbiológicas, as contaminações físicas podem ter fácil resolução, quer pelo operador do setor alimentar quer pelo consumidor, pois são facilmente visíveis. Quando não são detetados e são ingeridos com os alimentos podem originar graves lesões no consumidor (Veiga et al. 2009).

2.2. Principais agentes biológicos transmitidos pelos alimentos

Sabe-se que alimentos preparados em larga escala estão cada vez mais envolvidos em casos de surtos alimentares, frequentemente associados à contaminação microbiana. As doenças transmitidas ocorrem pela ingestão de água ou alimentos contaminados com agentes físicos, químicos ou biológicos, sendo a contaminação por agentes biológicos através de microrganismos a causa mais frequente. A contaminação de alimentos por águas deve também ser considerada, pois, se estiverem presentes microrganismos patogénicos, poderão comprometer a saúde do consumidor (Lima et al. 2015).

Em unidades de alimentação, a contaminação dos alimentos pode ocorrer em todas as etapas do processamento, desde o armazenamento até à distribuição, além da utilização de matérias-primas contaminadas. O problema assume maior relevância quando os produtos são consumidos por um número considerável de pessoas (Lima et al. 2015).

As doenças de origem alimentar provocadas por microrganismos são uma das preocupações de saúde pública a nível mundial. Cerca de 90% das doenças transmitidas por alimentos são por bactérias (Veiga et al. 2009).

Segundo o relatório da EFSA e ECDC (2017), os agentes de doença de origem alimentar mais frequentes são o *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., *Escherichia coli* verotoxigénica (VTEC ou STEC) e *Listeria* spp..

O estabelecimento de uma classificação de perigo, quanto à sua severidade e difusão, constitui um passo importante no estabelecimento de medidas preventivas. A severidade e difusão de diferentes microrganismos patogénicos bacterianos são descritas na Tabela 1 (Morgado 2007; Veiga et al. 2009).

Tabela 1 – Caracterização quanto ao risco e difusão dos perigos biológicos (adaptado de Morgado 2007; Veiga et al. 2009).

Classificação do risco e sua difusão	Microrganismos patogénicos
1. Moderado com difusão limitada , sem risco de vida, sem sequelas, normalmente de curta duração e autolimitantes.	<i>Bacillus cereus</i> <i>Campylobacter jejuni</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Vibrio cholerae</i> não O1 <i>Giardia lamblia</i>
2. Moderado com elevada difusão , incapacitante, com sequelas raras e de duração limitada.	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Salmonella</i> spp. (excluindo <i>typhi</i> e <i>paratyphi</i>) <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC) <i>Shigella</i> spp. (excluindo <i>disenteriae</i>) Rotavírus <i>Cryptosporidium parvum</i>
3. Severo , risco de vida para a população em geral, sequelas crónicas e longa duração.	<i>Clostridium botulinum</i> <i>Vibrio cholerae</i> O1 <i>Salmonella typhi</i> e <i>paratyphi</i> <i>Shigella disenteriae</i> <i>Brucella abortus</i> e <i>suis</i>
4. Severo para grupos de risco , risco de vida para populações, restritas sequelas crónicas e de longa duração.	<i>Campylobacter jejuni</i> <i>Listeria monocytogenes</i> EHEC

As doenças provocadas por alimentos estão em constante modificação, variando de época para época. Assim, para além das infeções habituais é necessário estar alerta para infeções emergentes por novos microrganismos patogénicos ou por outros já conhecidos mas com novas características ou presentes em veículos inesperados, além de se dever considerar diferentes hábitos alimentares e o mercado alimentar internacional (Viegas 2010).

Os seres humanos são hospedeiros de um elevado número de vírus que se reproduzem nos intestinos, e de seguida, são excretados nas fezes. Estes agentes biológicos não se multiplicam nem sobrevivem por longos períodos de tempo nos alimentos, pois são incapazes de se reproduzir fora de uma célula viva (Baptista and Venâncio 2003; Baptista and

Linhares 2005). A maioria dos vírus agentes de infecções alimentares são de transmissão fecal-oral, o homem pode ser infectado por ingestão de alimentos ou água contaminados. Os alimentos associados são bivalves (ostras, mexilhões e vieiras), mariscos e hortofrutícolas contaminados por deficiente higiene ou águas contaminadas (Henriques 2014). Os vírus mais implicados em doenças de origem alimentar são os da hepatite A e E, calicivírus, vírus de Norwalk, rotavírus e astrovírus (Prescott et al. 2005).

Os vermes e os protozoários são parasitas que podem originar doenças de origem alimentar. São organismos que necessitam sempre de um hospedeiro para se alimentar, desenvolver e multiplicar, com prejuízo para os hospedeiros. Os parasitas que estão associados a doenças de origem alimentar podem ser agrupados em protozoários e helmintos. Podem ter transmissão fecal-oral ou por consumo de alimentos mal cozinhados obtidos de animais infectados. Entre os principais parasitas causadores de doenças de origem alimentar estão a *Trichinella spiralis*, *Anisakis simplex*, *Ascaris lumbricoides*, *Diphylobothrium* spp., *Entamoeba histolytica*, *Taenia solium*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* e *Cyclospora cayetanensis* (Henriques 2014).

As leveduras e bolores compõem o Reino dos fungos. Em comparação com as bactérias, os fungos apresentam crescimento ótimo em pH ácido e em ambientes com baixa atividade da água. Por isso, entre os alimentos mais suscetíveis de contaminação encontram-se os frutos, vegetais, cereais, queijos e alimentos salgados. As leveduras apenas são responsáveis pela deterioração dos alimentos, não estando normalmente associadas a qualquer risco para a saúde pública. Os bolores e os fungos filamentosos podem ser perigosos quando produzem micotoxinas. As espécies produtoras de micotoxinas mais frequentes pertencem aos géneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. As micotoxinas são estáveis a temperaturas elevadas o que as tornam difíceis de eliminar dos alimentos (Henriques 2014).

2.3. Dose infetante

A dose infetante consiste no número mínimo de microrganismos ou de toxinas necessários para causar doença, e pode variar de alguma forma em função da sensibilidade do consumidor, nomeadamente nos grupos de risco (Baptista and Venâncio 2003; Prescott et al. 2005). Para a maioria das bactérias é necessária a ingestão de um número elevado de células para causarem doença, mas noutras, como a *Escherichia coli* O157:H7, por exemplo, basta ingerir 10 células viáveis (Feng 2012).

A Tabela 2 apresenta a dose infetante para alguns microrganismos patogénicos, suscetíveis de causar doença em adultos saudáveis (FDA 2012).

No entanto, dada a variabilidade e alguma inconsistência nos valores existentes na literatura relacionada, os valores da dose infetante devem ser usados apenas para propósitos indicativos (Morgado 2007).

Tabela 2 – Doses infetantes de alguns microrganismos patogénicos (adaptado de FDA 2012).

Microrganismo patogénico	Dose infetante (ufc ou massa)
Infeciosos	
<i>Salmonella enteritidis</i>	1
<i>Campylobacter jejuni</i>	500-10 ⁴
<i>Listeria monocytogenes</i>	<10 ³
<i>Yersinia enterocolitica</i>	10 ⁴ -10 ⁶
<i>Escherichia coli</i>	
Enterotoxinogénia EC	10 ⁷ -10 ¹⁰
Enteropatogénica EC	10 ⁷ -10 ¹⁰
Enterohemorrágica EC O157:H7	10-100
Enteroinvasiva EC	200-5000
Toxi-infeciosos	
<i>Bacillus cereus</i> – células	10 ⁵ -10 ⁸
<i>Clostridium perfringens</i>	
Células	>10 ⁶
Esporos	>10 ⁶ /g
Causadores de intoxicação	
<i>Staphylococcus aureus</i>	
Células	<10 ⁵
Enterotoxinas	<1µg

2.4. Incidência e notificação de toxinfecções alimentares na EU

Os casos registados e notificados de doenças com origem nos alimentos constituem uma pequena parte do total de ocorrências destas doenças. A probabilidade de um caso ser reconhecido e notificado pelas autoridades de saúde depende de vários fatores como a participação dos consumidores, o registo por parte das autoridades médicas e as ações desenvolvidas pelas autoridades nacionais com responsabilidade de vigilância sanitária (Morgado 2007).

Desde 2005 que a declaração de surtos de origem alimentar se tornou obrigatória para todos os EM (Veiga et al. 2009).

É difícil rastrear doenças de origem alimentar, pois estas têm um período de incubação variável podendo ir de horas a semanas, após a ingestão do alimento contaminado. Quando se fazem entrevistas às pessoas afetadas estas têm dificuldade em lembrar-se o que comeram, e quanto mais tempo decorrer mais difícil se torna. Adicionalmente há normalmente pessoas que ingerem o alimento em causa e não desenvolvem doença (Roberts 2001).

2.5. Bactérias patogénicas

Apenas uma pequena porção das bactérias são nocivas para a saúde, outras são benéficas e são utilizadas na produção de alimentos como iogurtes, queijos e cerveja, enquanto outras decompõem os alimentos. A diferença entre bactérias decompositoras e bactérias patogénicas é importante para a prevenção de doenças de origem alimentar. A presença das patogénicas não é detetada a olho nu, pois não há alterações no aspeto, cheiro ou sabor do alimento, enquanto a presença de bactérias decompositoras pode ser visualmente detetada pela degradação do alimento, afetando a sua qualidade (Morgado 2007).

Muitos destes agentes nocivos estão frequentemente associados à manipulação dos alimentos por parte dos operadores, e aos produtos crus contaminados utilizados como matérias-primas nas unidades de restauração (Morgado 2007).

Vários microrganismos patogénicos incluindo *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, e *Listeria monocytogenes*, entre outros, são frequentemente encontrados nos alimentos produzidos nas cozinhas de restauração (Morgado 2007).

2.5.1. *Salmonella* spp.

A *Salmonella* é um género da família *Enterobacteriaceae*. São bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas, não são formadoras de esporos e têm a forma de bastonetes curtos; a maioria das espécies é móvel, com flagelos peritricos. Fermentam a glucose, produzindo ácido e gás, no entanto não metabolizam a lactose e a sacarose (Food Ingredients Brasil 2011; Hammack 2012). A temperatura ótima de crescimento é de aproximadamente 38°C, e a temperatura mínima é de 5°C (Food Ingredients Brasil 2011).

O género *Salmonella* divide-se em duas espécies, a *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, e possuem inúmeros serotipos (são conhecidos 2.579). A *S. enterica*, para além de ser a espécie mais preocupante para a saúde pública tem vários serotipos como *S. enteritidis* e *S. Typhimurium*, que são os mais frequentemente envolvidos em infeções de origem alimentar (Hammack 2012; Viegas 2010).

Os géneros alimentícios podem ser contaminados. Vetores como bovinos, porcos, e aves (galinhas, perus, patos e gansos) ou produtos como ervas aromáticas e especiarias, ovos e leite e seus derivados, pescado, camarão, frutas e vegetais também podem ser fontes de *Salmonella* spp, por poderem contactar com matéria fecal contaminada durante o seu cultivo (EFSA and ECDC 2017; Diakos and Borges 2011).

A contaminação do alimento ocorre por más práticas de manipulação, tratamento térmico insuficiente ou mesmo inexistente antes de consumo, e contaminação cruzada entre alimentos crus e processados (Diakos and Borges 2011).

2.5.2. *Escherichia coli* O157:H7

A *Escherichia coli* faz parte da microflora intestinal do Homem e de outros mamíferos, em especial ruminantes (gado bovino), ou seja, também podem ser de origem zoonótica. São bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas e pertencem à família *Enterobacteriaceae*. São organismos indicadores de contaminação fecal da água e alimentos. Sendo a maioria inofensiva, algumas estirpes causam doença no Homem após ingestão de alimentos, sendo a *E. coli* O157:H7 a mais frequente como agente de toxinfecção alimentar (Antunes and Peixe 2011).

As bactérias *E. coli* patogénicas são agrupadas pelos seus sintomas clínicos e mecanismos de patogenidade em seis grupos (Feng 2012):

- *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), conhecida como causadora da diarreia dos viajantes. A ETEC causa um quadro clínico semelhante à cólera mas mais ligeiro com diarreia aquosa e febre baixa. O microrganismo coloniza a proximidade do intestino delgado;
- *E. coli* enteropatogénica (EPEC), agente de diarreia aquosa em crianças, a diarreia infantil. A sintomatologia caracteriza-se por vómitos, febre, diarreia aquosa com muco, mas sem presença de sangue. O microrganismo destrói e coloniza as microvilosidades intestinais;
- *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) causa disenteria, caracteriza-se por febre e diarreia profusa contendo muco e sangue (cl clinicamente é indiferenciável da disenteria por *Shigella*). O microrganismo coloniza o cólon e tem um plasmídeo responsável pela sua virulência, ou seja, pela sua capacidade invasiva;
- *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ou verotoxigénica (VTEC ou STEC), produz uma toxina semelhante às produzidas pela *Shigella*. Nas situações de infeção por VTEC, o quadro clínico caracteriza-se por colite hemorrágica corresponde a diarreia profusa e sanguinolenta com dor abdominal, podendo também ocorrer vómito e febre baixa, mas menos frequente. O período de incubação é entre 3 a 9 dias e a doença dura 8 dias. Num pequeno número de casos, o microrganismo entra na circulação sanguínea e evolui para síndrome urémica hemolítica (HUS, anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiência renal), que é uma complicação grave e por vezes mortal (Antunes and Peixe 2011). A estirpe VTEC é a quarta zoonose mais frequente da EU com 6,073 casos relatados pelos EM (EFSA and ECDC 2017). Portugal notificou pela primeira vez 2 casos de VTEC no ano de 2017. O serotipo O157:H7 é o mais comum deste grupo e produz grandes quantidades de toxinas que danificam a parede intestinal;
- *E. coli* enteroagregativa (EAEC) é responsável por diarreia aquosa persistente, principalmente em crianças, com uma duração superior a 14 dias. Julga-se que a

EAEC adere à mucosa intestinal e elabora as enterotoxinas e citotoxinas, as quais resultam em danos da mucosa e diarreia secretória;

- *E. coli* enteroaderente (DAEC) tem sido associada de forma não consistente a diarreia.

Os animais podem ser portadores de estirpes patogénicas no intestino, podendo ocorrer contaminação da carne durante o abate e processamento posterior (Morgado 2007). A transmissão para humanos ocorre principalmente por consumo de alimentos contaminados com matéria fecal, como carnes mal cozinhadas, produtos à base de leite, frutas, vegetais e sumos (EFSA and ECDC 2017). A contaminação com matéria fecal da água e outros alimentos, bem como a contaminação cruzada durante a preparação dos alimentos pode ser responsável pela infeção. A transmissão por contacto direto entre pessoas também tem sido relatada (Morgado 2007).

2.5.3. *Listeria monocytogenes*

De todas as espécies do género *Listeria*, a *Listeria monocytogenes* é a causa de maior preocupação no que concerne a doenças causadas por alimentos, estando mesmo considerada das principais causas de morte com origem alimentar. A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa e um patogénico intracelular facultativo (Ramaswamy et al. 2007; Chen 2012). As células têm a forma de pequenos bastonetes e são móveis por flagelos (EFSA and ECDC 2017).

É um microrganismo resistente a condições ambientais adversas, é halotolerante, e consegue sobreviver e crescer desde uma temperatura inferior a 1°C até à temperatura corporal, intervalo que engloba a temperatura de refrigeração, o que a torna problemática para a indústria alimentar, onde tem uma elevada prevalência (Chen 2012). Assim, os alimentos prontos para consumo mantidos em refrigeração podem ser contaminados (Ramaswamy et al. 2007). A *Listeria monocytogenes* pode sobreviver, mas não cresce a temperaturas de -18°C (FSAI 2005).

Tem uma distribuição ubiqüitária com prevalência no solo, água, forragem e silagem de baixa qualidade, mas também tem outros reservatórios como os animais domésticos (bovinos, ovinos e caprinos) e selvagens infetados (EFSA and ECDC 2017; Santos and Alberty 2011; Welshimer 1968).

A literatura é abundante em relatos da presença de *Listeria* spp. em alimentos, seja nas matérias-primas, durante a produção ou processamento ou nos produtos já acabados em exposição nas prateleiras (Catão and Ceballos 2001).

Já foi isolada a partir de vários alimentos desde crus a processados, incluindo peixe e produtos de pesca, hortofrutícolas, queijos de pasta mole e semi-mole e outros produtos lácteos (EFSA and ECDC 2017).

A infecção por *Listeria monocytogenes* causa duas formas de doença nos humanos, a não invasiva ou gastroenterite febril, que ocorre nas pessoas saudáveis caracterizada por sintomas que incluem náusea, vômito, febre e diarreia que normalmente é autolimitante, e a forma invasiva com consequências severas em grupos de risco como mulheres grávidas, recém-nascidos e idosos, e que se caracteriza por septicemia, encefalite e meningite. Pode levar a aborto, nascimento de feto morto ou prematuro quando a grávida é infetada no segundo e terceiro trimestre (Chen 2012). O período de incubação é variável de 1 dia a 3 semanas, a duração da doença é desconhecida (Roberts 2001).

2.6. Fatores que afetam o crescimento bacteriano

Todos os microrganismos, tal como todos os seres vivos, necessitam de um conjunto de fatores que lhes permitam crescer ou viver num determinado ambiente. Estes fatores diferem de microrganismo para microrganismo, por exemplo, as bactérias requerem ambientes diferentes das leveduras e estas de bolores, assim como dentro do grupo das bactérias há diferenças de espécie para espécie (In food Quality [date unknown]).

É possível determinar a probabilidade de ocorrência de microrganismos, patogénicos ou não, nos alimentos, desde que se considerem os vários fatores que determinam a sua sobrevivência e crescimento. Sendo os alimentos excelentes meios de desenvolvimento de microrganismos, o seu crescimento é condicionado por fatores intrínsecos e por fatores extrínsecos (Prescott et al. 2005). São de considerar ainda os fatores implícitos, que têm que ver com as características dos próprios microrganismos. Estes diversos fatores exercem uma seleção sobre a flora microbiana inicial, beneficiando desse modo umas espécies em detrimento de outras. A manipulação destes fatores permite assim, obter produtos com maior tempo de vida útil e com qualidade microbiológica superior (In Food Quality [date unknown]).

Os fatores intrínsecos consistem nas propriedades físicas e químicas do próprio alimento, nomeadamente a atividade da água (a_w), pH e nutrientes, ou seja, são inerentes aos alimentos. Os extrínsecos relacionam-se às condições de armazenamento e ambientais onde se encontra o alimento, tal como a temperatura (In food Quality [date unknown]).

2.6.1. Fatores intrínsecos

Designam-se por fatores intrínsecos todos os que dizem respeito às características físico-químicas dos alimentos. Estes fatores têm uma ação preponderante sobre o crescimento dos microrganismos, pois quase todos os alimentos constituem um meio mais ou menos favorável ao crescimento da maioria dos microrganismos (In food Quality [date unknown]).

2.6.1.1. Atividade da água

Os microrganismos precisam de água numa forma disponível para crescerem nos alimentos. A atividade da água (a_w) representa a disponibilidade de água num produto para o desenvolvimento microbiano, e o seu valor varia de 0 a 1 (Prescott et al. 2005). A a_w pode ser controlada de diversas maneiras, nomeadamente pela adição de substâncias como o sal ou o açúcar, ou por processos de secagem, liofilização ou congelação, sendo o objetivo baixar a a_w (Henriques 2014).

A maioria dos alimentos frescos (carnes, peixe, frutos e vegetais) tem valores de a_w entre 0.97 e 0.99, valores próximos das condições ótimas para o crescimento de muitas bactérias. Quando a a_w é inferior a 0.85, o crescimento da maioria das bactérias patogénicas é inibido; para valores de a_w abaixo de 0.90, a produção de toxinas é inibida, exceto para *Staphylococcus aureus*. Os fungos têm a capacidade de se desenvolverem a valores de a_w inferiores, de 0.60 a 0.70 (Pinto and Neves 2010).

É de notar que apesar do crescimento microbiano num determinado alimento não ser possível, não significa que os microrganismos não estejam presentes. Um grande número de microrganismos é capaz de se manter latente em alimentos com baixa a_w , e após reidratação podem retomar a capacidade de crescer. Neste caso, alimentos como o sal, o açúcar ou a farinha podem constituir excelentes fontes de microrganismos contaminantes durante a preparação de outros alimentos (In food Quality [date unknown]).

2.6.1.2. pH

O pH é outro fator importante a ter em conta. O pH é uma medida indicadora do grau de acidez ou alcalinidade de um produto. Os fungos preferem alimentos mais ácidos e as bactérias alimentos com pH próximo da neutralidade a alcalino, pelo que na degradação de produtos cárneos as bactérias são dominantes (In food Quality [date unknown]).

A redução do pH de um alimento tem como consequência a diminuição do crescimento microbiano, nomeadamente da maioria das bactérias patogénicas (Henriques 2014).

O pH afeta não só o crescimento dos microrganismos nos alimentos, mas também a sua taxa de sobrevivência durante o armazenamento e os diversos tratamentos de conservação (In Food Quality [date unknown]).

2.6.1.3. Disponibilidade de nutrientes

À semelhança de qualquer organismo, os microrganismos necessitam de um conjunto básico de nutrientes para o seu crescimento e para que possam realizar as suas funções metabólicas. O maior ou menor conteúdo em proteínas ou açúcares (fonte de energia) e outros nutrientes, vai determinar qual o tipo de microrganismos capazes de, preferencialmente, crescer nesse alimento (In food Quality [date unknown]).

A composição do alimento é um fator muito importante. Os alimentos ricos em hidratos de carbono como o pão e a fruta, são deteriorados maioritariamente por fungos, não libertando mau odor. Já a degradação de alimentos ricos em proteína e/ou gorduras como a carne ou a manteiga, é maioritariamente realizada por bactérias e a sua putrefação liberta odores desagradáveis (Prescott et al. 2005).

Os microrganismos apresentam diferentes exigências quanto à necessidade de nutrientes. A presença de vitaminas e aminoácidos vai permitir o crescimento de alguns dos microrganismos mais exigentes a nível nutricional. De uma forma geral, os bolores constituem o grupo de microrganismos nutricionalmente menos exigentes, seguidos pelas leveduras e estas pelas bactérias (In food Quality [date unknown]).

2.6.1.4. Potencial oxidação-redução (Eh)

As reações de oxidação-redução são essenciais para os microrganismos na obtenção de energia. Em sistemas aeróbios, como a carne picada e algumas frutas, o potencial atinge valores de 300 mV, permitindo o crescimento de microrganismos tipicamente aeróbios, como a *Pseudomonas* spp. e bolores. Em sistemas anaeróbios, tem valores de -150 mV e, portanto, as bactérias lácticas e *Clostridium* spp. conseguem sobreviver (Henriques 2014). Quando os produtos cárneos são confeccionados, o seu potencial oxidação-redução diminui, ficando com maior disponibilidade de aminoácidos, péptidos e fatores de crescimento e constituindo meios ideais para o crescimento de anaeróbios (Prescott et al. 2005).

2.6.1.5. Estrutura física do alimento e mecanismos antimicrobianos

O processamento dos géneros alimentícios com alteração da sua estrutura física como é o caso da carne picada, incluindo hambúrgueres, aumenta a área superficial e altera a estrutura celular, mas também distribui os microrganismos contaminantes pelo alimento (Prescott et al. 2005).

Determinados alimentos, de origem animal ou vegetal, apresentam estruturas biológicas que operam como barreiras físicas, capazes de impedir a invasão por microrganismos. São exemplos a casca de frutos e vegetais, as escamas do pescado, a pele dos animais, conchas de mariscos e a casca do ovo. A conservação das estruturas biológicas pode ser essencial para prevenir a entrada, e posteriormente, o desenvolvimento microbiano. Alguns danos causados nas cascas de alguns frutos e vegetais durante as fases de colheita, transporte, armazenamento, podem possibilitar a penetração de microrganismos e auxiliar o acesso aos nutrientes indispensáveis para o seu desenvolvimento (Baptista and Linhares 2005).

A presença de substâncias antimicrobianas naturais nos alimentos inibe a atividade microbiana como é o caso da lisozima, uma enzima encontrada na clara de ovo, ou do ácido

benzoico nas ameixas, morangos e amoras, com ação bactericida e fungicida (Prescott et al. 2005; Baptista and Venâncio 2003).

2.6.2. Fatores extrínsecos

Estes fatores, que dizem respeito às condições de armazenamento dos alimentos e às condições ambientais, assumem grande importância na medida em que podem ser facilmente modificados de maneira a prolongar a vida útil do alimento.

2.6.2.1. Temperatura

A temperatura é um fator crucial para o crescimento bacteriano, não sendo por acaso que a utilização de temperaturas de risco na conservação de alimentos, assim como a utilização de temperaturas inadequadas durante a sua preparação, processamento ou subprocessamento, sejam apontadas como principais causas de toxinfecções (In food Quality [date unknown]).

Todos os microrganismos necessitam de uma determinada temperatura para se desenvolverem à sua velocidade máxima, designada temperatura ótima, e com base nas exigências de temperatura para o seu desenvolvimento podem ser divididos em quatro grupos (Tabela 3).

Tabela 3 – Classificação dos microrganismos quanto à sua temperatura ótima de crescimento (adaptado de Prescott et al. 2005).

Temperaturas ótimas de crescimento (°C)	
Psicrófilos	<15
Psicrotróficos	20 a 30
Mesófilos	20 a 45
Termófilos	55 a 65

A maioria dos microrganismos patogénicos encontra condições ótimas de crescimento entre os 30°C e os 45°C, mas existem bactérias patogénicas que sobrevivem a baixas temperaturas como *Yersinia enterocolitica* e *Listeria monocytogenes*, que podem sobreviver e crescer a temperaturas de refrigeração, ou que resistem a temperaturas elevadas como o *Staphylococcus aureus* que pode sobreviver a temperatura de 60°C durante 15 minutos (Henriques 2014). É de salientar que quanto mais próximo da temperatura ótima de desenvolvimento se encontrar o alimento mais rápido é o crescimento bacteriano (In food Quality [date unknown]).

A temperatura de maior risco para a manutenção de alimentos situa-se entre os 4° e os 63°C, é a chamada “zona de perigo”, sendo a temperatura ótima de crescimento para a maioria dos patogénicos por volta dos 37°C. Abaixo dos 4°C algumas bactérias conseguem multiplicar-se lentamente, reduzindo a sua atividade metabólica. Quando a temperatura aumenta, as bactérias voltam a encontrar as condições adequadas para a sua multiplicação. Acima dos 63°C as bactérias começam a morrer, aumentando a taxa de mortalidade com o aumento do tempo de exposição. O binómio tempo/temperatura utilizado durante o processamento do alimento, deve ser controlado de modo a que iniba a multiplicação de agentes patogénicos eventualmente presentes, assegurando a inocuidade dos géneros alimentícios (Correia 2015). O calor mata os microrganismos mas o frio inibe ou retarda o seu crescimento, e certos microrganismos podem manter-se viáveis por longos períodos em alimentos congelados, como é o caso da *Listeria monocytogenes* (Ramaswamy 2007).

Para os fungos, a gama de temperaturas ótimas situa-se entre 25°C e os 45°C. Alguns fungos conseguem desenvolver-se a temperaturas de refrigeração acima dos 0°C, como o *Penicillium roqueforti*, e também a temperaturas elevadas como o *Aspergillus fumigatus*, que sobrevive a temperaturas de 55°C (Baptista and Linhares 2005).

2.6.2.2. Humidade relativa

O parâmetro humidade relativa influencia a a_w do alimento, se um alimento tem um valor baixo de a_w e estiver armazenado num ambiente com humidade relativa elevada, o valor da água disponível desse alimento aumenta, podendo esta absorção causar modificações no próprio alimento, diminuindo a qualidade do produto e proporcionar o crescimento microbiano (Baptista and Venâncio 2003). A humidade relativa é influenciada pela temperatura. Em regra, quanto mais elevada a temperatura de armazenagem, menor a humidade relativa, e vice-versa (Prescott et al. 2005).

2.6.2.3. Composição da atmosfera

Outro parâmetro a ter em conta é a composição da atmosfera que contacta com o produto. A presença ou ausência de oxigénio livre são determinantes no crescimento microbiano, podendo classificar-se os microrganismos em aeróbios estritos, aeróbios, anaeróbios facultativos ou anaeróbios estritos (Correia 2015). A utilização de atmosferas modificadas é um método de preservação que possibilita a embalagem de alimentos sob atmosfera controlada, inibindo o crescimento bacteriano por variação da composição da atmosfera normal, alterando a percentagem dos gases como o dióxido de carbono, azoto e oxigénio (Henriques 2014).

A maioria das bactérias patogénicas é anaeróbia facultativa, ou seja, são microrganismos que não requerem oxigénio para o seu crescimento, mas crescem melhor na

sua presença. Neste grupo incluem-se as *Enterobacteriaceae* e *Listeria monocytogenes* (Prescott et al. 2005; Henriques 2014).

Na Tabela 4 mostram-se os valores de alguns parâmetros que afetam o desenvolvimento de microrganismos patogênicos.

Tabela 4 – Fatores que afetam o crescimento bacteriano nos alimentos (adaptado de FSAI 2005; Morgado 2007; FDA 2012).

Perigos microbiológicos	Limites de crescimento					
	T _{min} (°C)	T _{máx} (°C)	pH _{min}	pH _{máx}	a _w min	NaCl _{máx} (%)
<i>Bacillus cereus</i>	4	48	4.9	9.3	0.93	7.5
<i>Campylobacter jejuni</i>	30	45	4.9	9	0.98	2
<i>Clostridium perfringens</i>	6	50	5.5	9	0.94	7
<i>Escherichia coli</i>	10	45	4.4	9	0.95	6,5
<i>Listeria monocytogenes</i>	-1.5	45	4.3	9.6	0.92	12 a 16
<i>Salmonella</i> spp	4	55	3.6	9.5	0.92	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	47.8	4.5	9.3	0.83	20
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-1	42	4	10	0.93	7

2.7. Fatores que contribuem para doença alimentar

Os surtos de doenças de origem alimentar surgem devido a uma sequência de eventos, diferindo de certa forma para cada agente etiológico. Após a contaminação do alimento, devem existir condições de tempo e temperatura adequadas para que ocorra o crescimento do microrganismo ou a produção de toxina até atingirem valores suficientes para ocorrer a doença. Adicionalmente, a sua presença no produto final pode ser sinónimo de processamentos ou armazenamento incorretos que permitiram a sobrevivência e crescimento do microrganismo ou foram incapazes de desnaturar a toxina (Morgado 2007).

A ocorrência de toxinfecções alimentares em unidades de restauração tem sido relacionada com diversos fatores relativos a más práticas de fabrico e higiene, que têm como consequência a contaminação dos alimentos por microrganismos patogênicos e a diminuição do seu tempo de vida útil (Baptista and Linhares 2005; Bolton and Maunsell 2004):

2.7.1. Matérias-primas contaminadas

Na restauração, a variedade de produtos utilizados é muito diversa, pelo que é necessário selecionar fornecedores qualificados e de confiança, que ofereçam garantias da qualidade dos seus produtos, já que a qualidade do produto final é influenciada pela qualidade das matérias-primas utilizadas. Devem ser estabelecidos e documentados os requisitos para

que seja garantida a conformidade das matérias-primas e é essencial que o fornecedor cumpra todos os requisitos legais relativos à higiene e segurança alimentar (Baptista and Linhares 2005).

A desinfecção dos hortofrutícolas, frutas e vegetais é um procedimento que nem sempre é colocado em prática pelos operadores. Contudo, muitas intoxicações alimentares resultam de procedimentos de higienização incorretos na sua preparação e manipulação (Baptista and Linhares 2005).

Todos os produtos hortícolas a servir crus, incluindo ervas aromáticas, têm que ser bem lavados e desinfetados, devendo depois ser guardados na câmara de refrigeração, protegidos, até ao momento de servir (Baptista and Linhares 2005).

Os frutos devem ser cuidadosamente lavados, de modo a remover a sujidade e alguns dos potenciais contaminantes como, pesticidas mas não necessitam de serem desinfetados. Preferencialmente os frutos devem ser consumidos sem casca, devido a presença de pesticidas. A preparação de sumos deverá ser realizada no momento do seu consumo, evitando assim perda de nutrientes, vitaminas, e possíveis alterações organoléticas (Baptista and Linhares 2005).

2.7.2. Manipulações inadequadas que originam contaminações cruzadas

Para alimentos crus e prontos a consumir devem usar-se utensílios e equipamentos de cores diferentes, como placas de corte coloridas e utensílios das mesmas cores, para ajudar a manter a separação dos equipamentos e utensílios (Monteiro 2016).

Os alimentos crus devem ser manipulados em zonas diferentes daquelas onde se manipulam os alimentos confeccionados. Nos casos em que a disposição do local não o permita, as operações devem ser separadas no tempo por uma fase de limpeza e desinfecção. Os manipuladores devem respeitar todas as regras de higiene pessoal, lavando as mãos no local destinado para o efeito, antes de iniciar cada tarefa; na mesma bancada não devem coexistir alimentos crus e confeccionados, ou alimentos na proximidade de lixos ou objetos sujos para evitar contaminação cruzada; não é permitido que a mesma faca ou tábua de corte seja utilizada simultaneamente com alimentos crus e confeccionados, e com alimentos de origem vegetal e animal; os alimentos deverão permanecer entre 4°C e 63°C, na “zona de perigo”, o menor tempo possível; os alimentos devem ser colocados na câmara de refrigeração, devidamente acondicionados, após a sua preparação e até à sua confeção (Baptista and Linhares 2005).

2.7.3. Área/zona de receção

A operação de receção deve ser efetuada exclusivamente no local específico para tal. A área de receção das mercadorias deve estar sempre limpa e desimpedida, e os produtos

rececionados devem permanecer nessa área o mínimo tempo possível. A zona de receção não deve ter ligação direta com a zona de preparação/confeção dos alimentos (Baptista and Linhares 2005).

2.7.4. Armazenamento à temperatura ambiente (10°C a 21°C)

A correta conservação dos alimentos tem em conta as características do próprio alimento, o tempo de armazenamento e fatores ambientais como temperatura, humidade relativa, conveniente circulação de ar, proteção da luz solar, isolamento dos alimentos que transmitam odores e condições de higiene do local (Baptista and Antunes 2005).

Devem existir registos de todas as entradas e saídas de produtos do armazém; os produtos devem ser agrupados por famílias de alimentos; deve ser cumprida a regra FIFO (da literatura inglesa *first in first out*) na rotação de stocks; a data de validade deve ser verificada; as embalagens amolgadas, opadas ou ferrugentas devem ser rejeitadas; o armazém deve ser higienizado com a frequência necessária e os produtos químicos de higienização devem ter um local próprio e identificado; estes armazéns devem de ser de uso exclusivo para produtos alimentares (Baptista and Linhares 2005).

2.7.5. Armazenamento a baixas temperaturas

Baseia-se na redução da atividade dos microrganismos presentes nos alimentos e das suas enzimas, pela ação do frio. Os processos de conservação a baixas temperaturas mais utilizados são o armazenamento em câmaras frigoríficas e de congelação. Nestes equipamentos deve ser controlada e registada a temperatura pelo menos duas vezes por dia; também deve ser registada a sua higienização; as portas devem estar abertas o menor tempo possível; a disposição dos produtos no interior das câmaras tem de permitir a circulação de ar frio entre eles, não devem contactar diretamente com a parede, devem estar devidamente acondicionados e etiquetados e com a data de entrada na câmara. Por norma, quanto maior for a qualidade inicial do alimento maior será o tempo de vida em refrigeração e congelação (Baptista and Antunes 2005).

Para os alimentos terem uma conservação bem-sucedida em refrigeração, a temperaturas entre 1°C e 4°C, deve manter-se sempre a higiene adequada dos equipamentos; os alimentos devem ser devidamente acondicionados em embalagens com tampa ou cobertos com película aderente; não devem ser colocados alimentos quentes na câmara frigorífica, o que provocaria aumento da temperatura interna com formação de condensação, favorecendo a contaminação cruzada e o possível crescimento bacteriano e de bolores; se houver mais de uma câmara os alimentos devem estar agrupados por grupos; a disposição dos alimentos no seu interior deve ser da prateleira superior para a inferior,

alimentos cozinhados, as carnes e peixes crus, os vegetais nas prateleiras inferiores ou apropriadas e os produtos em descongelação na parte inferior (Baptista and Linhares 2005).

O armazenamento de produtos congelados permite uma conservação de alimentos durante um longo período de tempo. A temperatura de eleição é de -18°C , uma vez que a esta temperatura ou inferiores não se verifica crescimento bacteriano. Devem ser cumpridos requisitos para uma adequada conservação, nomeadamente, os alimentos recebidos com temperaturas superiores a -15°C devem ser avaliados; os alimentos congelados recebidos devem ser colocados imediatamente no congelador; os alimentos congelados devem ser devidamente acondicionados para evitar alterações como a “queimadura de frio”; as temperaturas têm de ser controladas para evitar flutuações; os alimentos descongelados não devem voltar a ser congelados e em caso de avaria do equipamento os alimentos descongelados devem ser cozinhados imediatamente e consumidos para evitar prejuízos (Baptista and Linhares 2005).

2.7.6. Práticas incorretas de descongelação

Os alimentos devem estar bem descongelados antes da confeção, garantindo que as temperaturas atingidas no interior do alimento durante a confeção atinjam valores seguros (Baptista and Linhares 2005).

Os produtos devem ser descongelados em ambiente refrigerado, a temperaturas entre 1°C a 4°C , e nunca à temperatura ambiente. Os alimentos devem ser colocados a descongelar com a devida antecedência, no máximo 72 horas, para a total descongelação antes da confeção. O seu consumo deve ser dentro das 24 horas seguintes, armazenado em refrigeração. Existem alimentos, normalmente de dimensões menores, que dispensam esta etapa antes da confeção como legumes, batata pré-frita, rissóis e camarão. Durante e após a fase de descongelação o alimento deve ser colocado em grelhas de plástico ou inox, ou em tabuleiros que permitam que os sucos escorram. Se o alimento for confeccionado seguidamente, a descongelação pode também ser realizada no micro-ondas. Todos os recipientes e utensílios envolvidos devem ser limpos e desinfetados o mais rapidamente possível (Baptista and Linhares 2005).

2.7.7. Confeção inadequada

A temperatura elevada é um dos métodos de maior eficiência e um dos mais utilizados na destruição de microrganismos. O calor pode ser aplicado tanto em condições húmidas (vapor ou água) como secas (estufa com ar quente e seco) (Carvalho 2010).

A destruição microbiana não depende apenas da temperatura como também do tempo a que o alimento é submetido a essa temperatura e da sua contaminação inicial (Carvalho 2010).

O calor húmido pode ser aplicado sob a forma de vapor, água fervente ou água aquecida a temperaturas abaixo da sua temperatura de ebulição (Carvalho 2010). A confeitura é assim, um processo que torna possível a destruição de microrganismos. Para assegurar a destruição de microrganismos deve-se alcançar, durante o processo de confeitura a quente do alimento, uma temperatura superior a 75°C, verificada em diferentes pontos do alimento com um termómetro. Alguns produtos não podem, por razões culinárias, ser confeccionados com temperaturas acima de 75°C, pelo que devem ser consumidos imediatamente após a sua confeitura (Baptista and Linhares 2005).

O calor seco ou ar quente com temperaturas suficientemente altas destrói os microrganismos, mas são necessárias temperaturas mais elevadas e com tempo de exposição maior em relação ao calor húmido. No entanto, há situações em que um material não possa ser exposto à humidade e o método pelo calor seco é preferencial (Carvalho 2010).

Os alimentos nunca devem permanecer à temperatura ambiente mais do que uns minutos. Após a confeitura do produto a quente, toda a manipulação deve ser reduzida ao mínimo imprescindível, para evitar uma contaminação posterior dos produtos cozinhados (APHORT [date unknown]).

Os alimentos cozinhados e servidos frios devem ser conservados a uma temperatura igual ou inferior a 5°C. Os pratos frios não sofrem mais tratamentos térmicos na cozinha antes de serem servidos (APHORT [date unknown]).

Na confeitura de alimentos podem ocorrer contaminações químicas inerentes ao próprio processo de confeitura. O processo de fritura degrada os óleos alimentares e gera produtos tóxicos que podem contaminar os alimentos e causar problemas aos consumidores. Deve fazer-se o respetivo controlo, de forma empírica pela observação das características organoléticas ou com recurso a testes colorimétricos que avaliam o teor em compostos polares presentes, e proceder à sua substituição, sempre que necessário (Pereira 2009).

A manipulação de alimentos confeccionados nunca deverá ser feita diretamente com as mãos, deve ser realizada com luvas. Esta manipulação deve ser mínima, uma vez que há sempre a possibilidade de ocorrer contaminação cruzada, seja através de utensílios, equipamentos e manipuladores (Pereira 2009).

O empratamento é uma etapa onde é possível a recontaminação ou a multiplicação de eventuais microrganismos, que tenham sobrevivido à confeitura, caso não se cumpram os devidos cuidados. Desta forma, é crucial que sejam cumpridas as normas de higiene e segurança alimentar, e se respeite os intervalos de temperatura a que os alimentos se devem encontrar (Baptista and Linhares 2005).

2.7.8. Arrefecimento impróprio

A rapidez do arrefecimento é fundamental para manter uma boa qualidade física e microbiológica dos alimentos. Para tal, é necessário que se alcance uma temperatura igual ou inferior a 10°C em menos de duas horas. É recomendado o uso de células de arrefecimento rápido, o abatedor de temperatura, equipamentos que arrefecem os alimentos desde a temperatura de confeção à de refrigeração num curto espaço de tempo. Na maioria dos estabelecimentos de restauração não existe este equipamento, assim o arrefecimento deve ser feito em banho de água gelada com os alimentos dentro do recipiente onde vão ser conservados em refrigeração, devidamente tapado e acondicionado (Baptista and Linhares 2005).

O tratamento das sobras é um assunto delicado. As sobras que não tenham sido servidas podem ser reaproveitadas, desde que a cadeia de frio tenha sido assegurada; o acondicionamento das sobras deve ser feito pela libertação das mesmas de molhos e acompanhamentos; as sobras quando quentes devem ser rapidamente arrefecidas, até uma temperatura inferior a 4°C, sendo de seguida acondicionados em câmaras de refrigeração, em recipientes devidamente cobertos e identificados, indicando o conteúdo e data de produção; as sobras não devem ser reaproveitadas em conjunto com novos produtos; todas as sobras que já tenham sido conservadas e tenham estado à temperatura ambiente, se não forem utilizadas, terão de ser rejeitadas e os alimentos de alto risco, como por exemplo produtos com ovo cru, carne picada ou bolos com cremes, pelas suas características, encontram-se por vezes na origem de intoxicações alimentares, pelo que não deverão ser conservados para posteriores utilizações (Baptista and Linhares 2005).

2.7.9. Manter a quente e reaquecimento

A manutenção a quente constitui um aquecimento temporário, pelo que deve ser aplicada no menor período de tempo possível. Os alimentos a servir quentes deverão ser mantidos a temperaturas superiores a 63°C até ao momento de consumo. Para tal deverão ser colocados banhos quentes, ou noutro equipamento adequado, cujas temperaturas devem estar reguladas para 80°C ou 90°C para que o alimento se mantenha pelo menos a 63°C (Baptista and Linhares 2005). O incumprimento deste limite crítico de temperatura poderá facilitar o crescimento bacteriano e produção de toxinas de agentes toxigénicos como *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e *Bacillus cereus* (Bolton and Maunsell 2004).

O reaquecimento é um processo no qual os alimentos confeccionados ou pré-confeccionados que não são servidos a temperaturas de refrigeração (pratos frios) devem ser reaquecidos imediatamente após armazenagem em refrigeração a temperaturas superiores a 70°C antes do seu consumo. Os alimentos não devem ser reaquecidos mais do que uma vez

e devem ser servidos num período máximo de 30 minutos. A prática de reaquecer e voltar a refrigerar não é aceitável (Bolton and Maunsell 2004; Baptista and Linhares 2005).

2.7.10. Outros fatores

As técnicas de diagnóstico estão a melhorar progressivamente permitindo a identificação das doenças e chegar à sua origem. As alterações na demografia, o estilo de vida dos consumidores, a procura de novos produtos, a economia e a produção alimentar estão a mudar a forma como o alimento é produzido e consumido (Roberts 2001).

3. Estratégias de prevenção e controlo

3.1. Boas Práticas de Fabrico

As boas práticas de fabrico (BPF) são um conjunto de normas e procedimentos exigidos na laboração de produtos alimentícios industrializados para o consumo humano, cujo objetivo principal é assegurar que os produtos sejam sempre fabricados com a qualidade exigida, com especial ênfase para a segurança. São procedimentos necessários para obtenção de alimentos salubres (Flisch 2016).

O manual de BPF é o documento que descreve as operações realizadas pelo estabelecimento, incluindo requisitos sanitários dos edifícios, a manutenção e higienização das instalações, dos equipamentos e dos utensílios, o controlo da água de abastecimento, o controlo integrado de vetores e pragas, controlo da higiene e saúde dos manipuladores e o controlo e garantia da qualidade do produto final (Flisch 2016). Das BPF constam também os códigos de Boas Práticas de Higiene (BPH) que se aplicam estritamente aos aspetos de higiene e segurança dos produtos (Pereira 2009).

A lista de verificação é utilizada para fazer uma avaliação preliminar das condições hígio-sanitárias de um estabelecimento produtor de alimentos. Permite identificar itens não conformes e a partir dos dados coletados, traçar ações corretivas para adequação dos requisitos, procurando eliminar ou reduzir perigos físicos, químicos e biológicos que possam comprometer os alimentos e a saúde do consumidor (Flisch 2016).

3.1.1. Manipuladores de alimentos

Designam-se manipuladores de alimentos todas as pessoas que preparam, confeccionam, empratam ou fornecem alimentos (Alves 2014). O manipulador é fundamental quando se trata da segurança dos alimentos, pois estando em contacto com os mesmos desde a origem até ao momento da comercialização, qualquer falha cometida pode transformá-lo num transmissor viável de agentes patogénicos (FAO and WHO 2003).

Quando não são adotadas medidas hígio-sanitárias ou as condições ambientais são insatisfatórias, a contaminação dos alimentos pode acontecer. Entretanto, a formação e a capacitação dos trabalhadores têm papel primordial, pois é através da prática de corretos hábitos de higiene no local de trabalho que os riscos são minimizados (Medeiros et al. 2017).

3.1.1.1. Higiene pessoal

O conceito de higiene pessoal refere-se ao estado geral de limpeza do corpo e das roupas das pessoas que manipulam alimentos, de forma a que não constituam uma fonte de contaminação dos mesmos (Baptista and Saraiva 2003). O operador para além de um elevado grau de higiene pessoal deverá usar vestuário adequado, limpo, e por vezes de proteção (WHO and FAO 2003; Regulamento nº 852/2004).

Os trabalhadores podem disseminar microrganismos como a *Salmonella* spp ou o vírus da hepatite A, mesmo após a remissão dos sintomas. Até mesmo pessoas saudáveis são portadores de um número considerável de bactérias como o *S. aureus*, *Listeria* spp *Streptococcus* spp, e de bactérias intestinais como a *Salmonella* spp., *Shigella* spp e *Escherichia coli*. Os microrganismos estão presentes nos lábios, nariz, mãos (inclusive unhas) e cabelo, além de na roupa, podendo passar para os alimentos onde se desenvolvem. Para além de microrganismos patogénicos, causadores de doença, podem ser transferidos microrganismos que deterioram os alimentos (Baptista and Saraiva 2003).

Um vestuário adequado e limpo, luvas intactas e redes ou toucas de cabelo devem ser usados para garantir que estas bactérias não são transferidas para os géneros alimentícios ou equipamentos (Baptista and Saraiva 2003; WHO and FAO 2003). Se os manipuladores de alimentos mantiverem uma higiene pessoal inadequada, podem transmitir microrganismos aos alimentos, mas também a utensílios e equipamentos onde se podem multiplicar, podendo vir a causar doenças a um elevado número de consumidores, podendo ser fatais (Viegas 2014; Baptista and Saraiva 2003).

O conjunto de regras, condições e práticas que asseguram uma adequada higiene pessoal constituem as Boas Práticas de Higiene Pessoal. O seu objetivo é garantir a higiene do manipulador e consequentemente contribuir para a segurança e higiene dos alimentos. Para que seja observada a sua execução, nomeadamente ao nível do corpo, fardamento e comportamento, é necessário que os trabalhadores sejam devidamente informados e consciencializados para a sua real importância (Faria 2010; Baptista and Saraiva 2003).

3.1.1.2. Formação

A formação e/ou instrução dos manipuladores de alimentos tem uma importância fulcral e deve ser adequada em matéria de higiene dos géneros alimentícios, para que possam desempenhar as suas funções (Regulamento nº852/2004).

A formação em higiene e segurança alimentar é essencial para reduzir os níveis de contaminação e garantir a segurança dos alimentos, e deverá contemplar, para além de formação em áreas relacionadas com a sua atividade, formação na área de higiene pessoal, boas práticas de fabrico e segurança alimentar. Os operadores que, direta ou indiretamente lidam com os produtos, devem estar conscientes da contaminação biológica, química e física de que são portadores (Baptista and Venâncio 2003).

Os programas de formação devem ser adequados às funções desempenhadas, realizar-se com alguma periodicidade e, os novos trabalhadores devem ser alvo de formação imediata, assim como deve ter um cariz prático e exemplificativo, de forma a motivar os trabalhadores para o cumprimento de todas as regras e para o desempenho das suas funções com elevados níveis de higiene (Baptista and Saraiva 2003).

3.2. Análise de Perigos e Pontos de Controlo Críticos (HACCP)

O sistema HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Point*) é um sistema preventivo que tem em vista garantir a segurança dos alimentos e um elevado nível de proteção do consumidor (Regulamento (CE) nº852/2004).

As pessoas esperam que os alimentos consumidos sejam seguros e adequados ao consumo. A ausência de inocuidade dos alimentos para além de ter consequências na saúde do consumidor, também tem impacto na economia do país afetado causando prejuízos no comércio e turismo. A deterioração dos alimentos torna-se dispendiosa pela perda do produto, do comércio e confiança dos consumidores (Bolton and Maunsell 2004).

A globalização e a crescente internacionalização das empresas do sector alimentar proporcionam importantes benefícios sociais e económicos, mas em contrapartida facilitam a difusão de doenças a escala mundial. Nas últimas décadas os hábitos alimentares sofreram alterações e desenvolveram-se novas técnicas de produção, preparação e distribuição de alimentos. O controlo higiénico eficaz é essencial para evitar as consequências devastadoras para a saúde humana e a economia, assim como para evitar a deterioração dos alimentos. Todos os intervenientes na cadeia alimentar, desde a produção primária ao consumidor final, têm a responsabilidade de assegurar que os alimentos são seguros e adequados para o consumo (Bolton and Maunsell 2004).

Para prevenir, reduzir ou eliminar a contaminação dos alimentos deve ser exercido controlo sobre as etapas pelas quais passam. Esse controlo é obtido se cumprirem os Programas de pré-requisitos e o plano HACCP. Os pré-requisitos constituem as bases para uma eficaz aplicação do HACCP, por isso devem ser executados previamente. Os pré-requisitos controlam os perigos associados com a envolvente à unidade de restauração (localização e estruturas, serviços, pessoal, instalações e equipamentos), enquanto o HACCP deve controlar os perigos associados com as etapas de processamento dos alimentos

(armazenamento e preparação), que revelem um risco significativo após a sua avaliação (Henriques 2014). Para um perigo ter um risco significativo, a sua ocorrência deve ser relativamente frequente e as suas consequências relativamente graves (Bolton and Maunsell 2004).

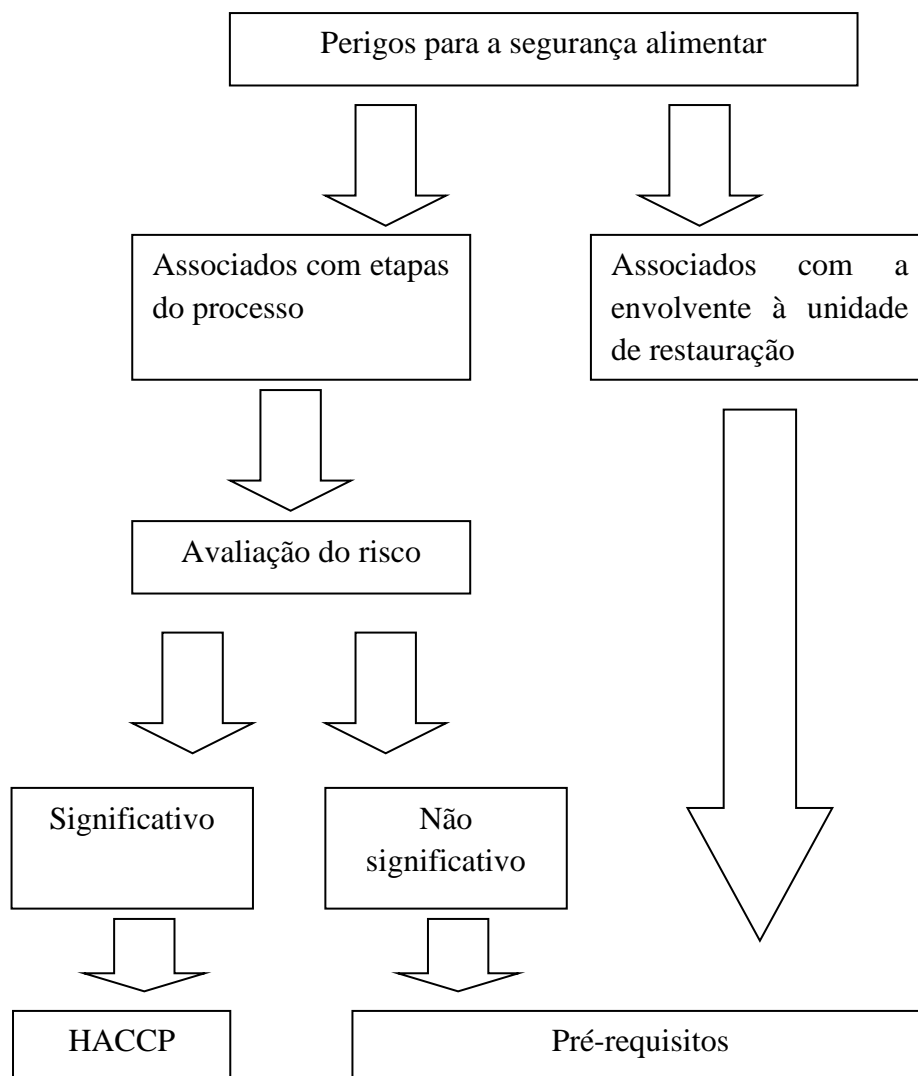


Figura 1 – Diferenciação de perigos não significativos e significativos, e decisão sobre o respetivo controlo, através de pré-requisitos ou do plano HACCP (adaptado de Bolton and Maunsell 2004).

Os programas de pré-requisitos exigidos para o setor de restauração incluem a localização da empresa, instalações e equipamentos, higiene do pessoal, serviços (como fornecimento de água, extração de vapores e remoção dos resíduos), limpeza (das instalações, equipamentos e utensílios), armazenagem, zonas de trabalho, controlo de pragas, controlo de fornecedores qualificados com garantia de qualidade e que permitam a rastreabilidade, controlo à receção, gerência e registos (Bolton and Maunsell 2004).

No desenvolvimento e aplicação de um plano HACCP devem ser considerados os sete princípios do HACCP. Seguidamente serão referidos os sete princípios (Bolton and Maunsell 2004):

- 1) O primeiro princípio, corresponde à análise de perigos significativos que possam surgir ao longo das etapas pelas quais o produto passa e descrever as medidas de controlo;
- 2) O segundo princípio é a determinação dos pontos de controlo críticos (PCC), ou seja, etapas onde é essencial a aplicação do controlo para prevenir ou eliminar um perigo potencial, ou reduzi-lo para níveis aceitáveis;
- 3) O terceiro princípio, é estabelecer os limites críticos, ou seja, determinar o intervalo de valores aceitáveis no controlo de um PCC, com objetivo de prevenir, eliminar e/ou reduzir para valores aceitáveis a ocorrência do perigo identificado;
- 4) O quarto princípio é o estabelecimento de um sistema de monitorização para avaliar se determinado PCC está sob controlo e criar registos corretos para uso futuro na verificação do sistema;
- 5) O quinto princípio, é referente ao estabelecimento de medidas corretivas que devem ser aplicadas quando a monitorização de um PCC indique que há um desvio inferior ou superior ao respetivo limite crítico,
- 6) O sexto princípio, manda estipular procedimentos de verificação para confirmação da eficácia do plano HACCP,
- 7) O sétimo princípio, prevê o estabelecimento de sistemas de registo e arquivo de dados que documentam todo o plano de HACCP.

Para a aplicação do sistema HACCP, estão preconizadas 12 etapas (Bolton and Maunsell 2004; WHO and FAO 2003; FQA and DCTA/ESAC 2002):

- 1) Reunir uma equipa HACCP

A equipa HACCP deverá ser multidisciplinar e incluir todos aqueles que possuem conhecimentos apropriados sobre os produtos finais, incluindo ingredientes, e tenham experiência nos processos utilizados. Nos estabelecimentos de restauração, a equipa deve incluir o chefe de cozinha, gerência, pessoal de apoio, e se necessário um consultor de segurança alimentar.

- 2) Descrever o produto

A equipa HACCP deve reunir um conhecimento o mais detalhado possível sobre o produto e processo de produção. Apesar do relativamente elevado número de produtos finais que poderão ser servidos num restaurante ou noutra estabelecimento do setor alimentar, esta informação deverá ser adquirida através dos fornecedores e rótulos dos produtos

- 3) Identificar o uso pretendido

A utilização prevista do produto deve ser baseada na sua utilização esperada pelo consumidor.

4) Construir um diagrama de fluxo

O diagrama de fluxo deve ser construído pela equipa HACCP e ser de fácil compreensão. Deve incluir todos os passos do processo em sequência, receção de matérias-primas, preparação, processamento, distribuição, e serviço ao consumidor. Num restaurante, o mesmo diagrama de fluxo pode ser utilizado para diversos produtos que sejam fabricados utilizando passos de processamento semelhantes.

5) Conferir no local o diagrama de fluxo

Esta confirmação efetua-se comparando as etapas do fluxograma com a operação que este representa no local. Deve ser corrigido quando se identificam desvios, ou se o processo se modificar ao longo do tempo.

6) Identificar todos os potenciais perigos associados a cada passo, realizar uma análise de perigos, e considerar quaisquer medidas de controlo dos perigos identificados (Princípio 1)

Feito o levantamento dos potenciais perigos para a segurança dos alimentos com possibilidade de vir a ocorrer numa cozinha, devem identificar-se as suas fontes que incluem as matérias-primas cruas, o ambiente, pessoal, produtos de limpeza e pragas. Além disso, qualquer etapa que possa contribuir para o aumento da contaminação ou da contaminação cruzada, deverá igualmente ser identificada.

Após a identificação dos potenciais perigos e das suas fontes, a equipa HACCP deve determinar se os perigos são significativos ou não significativos em termos de grau de risco.

De seguida, deve estabelecer medidas de controlo para os perigos identificados como significativos, os não significativos são controlados através do cumprimento dos pré-requisitos.

7) Determinar os pontos de controlo críticos (Princípio 2)

Nos PCCs são controlados os perigos que foram considerados significativos. Para decidir se determinado passo ou procedimento é o mais adequado para controlar cada um dos perigos significativos, pode utilizar-se uma árvore de decisão.

8) Estabelecer limites críticos para cada PCC (Princípio 3)

Os limites críticos são critérios que devem ser especificados e validados para cada PCC, para garantir que o controlo é atingido. Os critérios frequentemente utilizados incluem medições de temperatura, de tempo, de nível de humidade, de pH, de a_w , de cloro disponível, e parâmetros sensoriais como a aparência visual e a textura. Os limites críticos devem ser mensuráveis.

9) Estabelecer um sistema de monitorização para cada PCC (Princípio 4)

A monitorização é uma sequência planeada de observações que permite detetar situações fora dos limites estabelecidos para cada PCC. Pode envolver medições físicas e químicas. A obtenção da informação a tempo é importante para permitir restabelecer o controlo antes de ser necessário segregar ou destruir o produto. No caso de a monitorização não ser contínua a sua frequência deve ser definida no plano HACCP. A monitorização produz registos precisos para uso futuro na verificação do sistema.

10) Estabelecer ações corretivas (Princípio 5)

As ações corretivas devem garantir que o PCC foi colocado sob controlo. O plano de ações corretivas deve conter a ação a tomar de imediato, quem deve ser informado e o tipo de relatório a fazer, o que fazer com o produto que foi produzido e não está conforme, investigar sobre a possível causa do problema e os passos necessários para prevenir a sua ocorrência, e o responsável pela tomada de decisão.

11) Estabelecer procedimentos de verificação (Princípio 6)

Procedimentos de verificação incluem auditorias ao plano HACCP e seus registos, revisão de desvios e de ações corretivas, confirmação que os PCCs estão sob controlo, testes microbiológicos a produtos intermédios e produto final, pesquisa de problemas nos produtos da cadeia de distribuição ou postos de venda e análise do uso do produto por parte do consumidor.

12) Estabelecer um sistema de registos e documentação do HACCP (Princípio 7)

Todos os elementos já abordados devem ser compilados num documento formal designado por plano HACCP, preparado de acordo com os princípios do HACCP para assegurar o controlo dos perigos significativos para a segurança alimentar. A documentação e os registos devem ser apropriados para a natureza e tamanho da unidade de restauração, por vezes um sistema simples de manutenção de registos pode ser eficaz e facilmente comunicado aos trabalhadores.

4. Microrganismos indicadores de qualidade alimentar

Os alimentos estão expostos, durante a sua elaboração, a uma série de perigos ou oportunidades de contaminação microbiana, que podem estar relacionadas com práticas inadequadas de processamento e de manipulação e poderão originar doenças de origem alimentar, tanto mais relevantes quando os produtos são consumidos por um número considerável de pessoas (Lima et al. 2015; Neto and Rosa 2014).

O número e tipo de microrganismos presentes nos alimentos dependem do grau de contaminação das matérias-primas, do tempo de descongelação e cozedura, o aproveitamento de sobras alimentares, os equipamentos, superfícies e os instrumentos utilizados na preparação. É de salientar o papel do manipulador de alimentos como potencial

disseminador de microrganismos provenientes da sua microbiota ou de sujidades presentes especialmente nas mãos (Chouman et al. 2010).

A ingestão de alimentos contaminados pode causar prejuízos à saúde de quem os consome, sendo de extrema importância a investigação de qualidade microbiológica das refeições e da água oferecidas nos estabelecimentos de restauração, para que possam ser implementadas medidas efetivas de prevenção e controlo de microrganismos patogénicos (Lima et al. 2015).

Para determinar a qualidade microbiológica dos alimentos pode-se utilizar como parâmetros microrganismos indicadores de contaminação, grupos ou espécies de microrganismos que, quando presentes num alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de patogénicos ou sobre a deterioração potencial do alimento, além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção e armazenamento. Permitem perceber a qualidade microbiológica dos alimentos em relação à vida de prateleira ou à segurança para o consumidor (Ferreira et al. 2014). A maior aplicação dos microrganismos indicadores consiste na avaliação da qualidade global de um alimento e das condições de higiene durante o seu processamento.

Os microrganismos indicadores podem ser agrupados: microrganismos que não oferecem riscos para a saúde (mesófilos, psicrotróficos, termófilos, bolores e leveduras) e microrganismos que oferecem um risco baixo ou indireto para a saúde (coliformes totais, coliformes fecais, enterococos, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e *Staphylococcus aureus*) (ICMSF 2000).

4.1. Microrganismos aeróbios mesófilos a 30°C

São microrganismos com um crescimento ótimo para temperaturas compreendidas entre 20°C e 45°C, sendo a temperatura ideal em torno de 30°C. A maioria dos microrganismos, incluindo os patogénicos para os humanos faz parte desta categoria (Prescott et al. 2005).

Através da contagem dos microrganismos aeróbios mesófilos é possível fazer uma estimativa da carga microbiana total dos alimentos sem especificar qual o tipo de bactérias presentes. Este grupo é importante porque inclui a maioria dos contaminantes dos alimentos de origem animal, podendo atingir elevadas contagens quando o alimento é mantido à temperatura ambiente. O número de microrganismos aeróbios mesófilos encontrados num alimento é um dos indicadores de qualidade microbiológica dos alimentos mais utilizados, indicando se a limpeza, desinfecção e o controlo de temperatura durante a produção, transporte e armazenagem foram realizados de forma adequada. Contagens elevadas deste grupo de microrganismos fornecem informação sobre a alteração incipiente dos alimentos, a

sua provável vida útil, a falta de controlo na descongelação ou desvios na temperatura de refrigeração estabelecida e matéria-prima contaminada, como também os potenciais riscos para a saúde do consumidor (Ferreira et al. 2014). Os produtos fermentados devido ao seu processamento apresentam contagens elevadas, o que neste caso é desejável.

Como não é um método específico verifica-se que nem sempre contagens baixas de microrganismos aeróbios mesófilos a 30°C são sinónimos de alimentos higiénicos, assim como não garantem que o alimento está isento de microrganismos patogénicos, e as contagens elevadas também não estão necessariamente associadas à presença de bactérias patogénicas, podendo apenas indicar que houve condições para se poderem multiplicar nos alimentos (Castro 2008).

4.2. *Enterobacteriaceae*

A família *Enterobacteriaceae* é composta por mais de 40 géneros, são bactérias Gram-negativa, têm forma bacilar, podem ser móveis com flagelos peritricos ou imóveis dependendo da espécie, são aeróbias ou anaeróbias facultativas, não são formadores de esporos, são fermentadores de glucose e algumas fermentam a lactose, reduzem nitratos a nitritos, podem crescer numa variedade de meios sólidos não seletivos (p.e. agar sangue) e seletivos (p.e. agar MacConkey), são oxidase negativa e catalase positiva (Castro 2008; Oliveira et al. 2015).

A distribuição das Enterobactérias é ubiqüitária e como tal podem ser encontradas no solo, água, e vegetação, assim como são comensais da flora intestinal de humanos e animais. Os seus elementos estão entre os agentes patogénicos mais comuns que infetam seres humanos e animais. Como residentes da microflora intestinal podem representar colonização ao invés de infeção verdadeira (Oliveira et al. 2015).

Os principais géneros desta família podem ser divididos pela sua mobilidade. Assim, os géneros com flagelos peritricos são *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Proteus*, e os imóveis *Shigella*, *Yersinia* e *Klebsiella* (Prescott et al. 2005). Muitos dos géneros das enterobactérias são de origem não fecal, como tal a sua contagem é usada mais regularmente como qualidade hígio-sanitária dos alimentos do que como indicador de contaminação fecal (Castro 2008).

As bactérias da família *Enterobacteriaceae* podem ser usadas para avaliar a higienização pois são facilmente eliminados por desinfetantes (Castro 2008). Estão normalmente presentes em alimentos crus, mas como a maioria é sensível ao calor devem estar ausentes de alimentos processados com calor. Como tal, a sua presença em alimentos cozinhados mostra uma contaminação pós tratamento térmico (Ray and Bhiljnia 2008). As contagens elevadas de enterobactérias nos alimentos indicam uma elaboração pouco higiénica, contaminação numa fase posterior à elaboração ou ambas.

4.3. Outros microrganismos indicadores

4.3.1. Coliformes totais

Este grupo é composto por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, capazes de fermentar a lactose com produção de gás quando incubados a 35-37°C durante 48 horas. São bacilos Gram-negativos não formadores de esporos e incluem-se neste grupo bactérias pertencentes aos géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Hafnia* e *Klebsiella* (Oliveira et al. 2015; Ferreira et al. 2014). É um grupo formado por cerca de 20 espécies, entre as quais encontram-se bactérias originárias do trato intestinal de humanos e de animais de sangue quente (Geus and Lima 2000). São frequentemente utilizados como indicadores higio-sanitários no controlo da qualidade da água e alimentos.

Apenas a *Escherichia coli* tem como habitat exclusivo o trato intestinal do homem e de animais homeotérmicos. Os géneros *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* além de serem encontrados nas fezes, também podem estar presentes noutros ambientes como na vegetação e solo, onde persistem por tempo superior ao de bactérias patogénicas de origem intestinal como *Salmonella* e *Shigella*. Consequentemente, a presença de coliformes totais no alimento não indica necessariamente contaminação fecal recente ou ocorrência de enteropatogénicos (Ferreira et al. 2014).

Os coliformes são indicadores das condições de higiene dos processos de fabricação, porque são facilmente inativados pelos desinfetantes e capazes de colonizar vários nichos das áreas de processamento, quando a desinfecção é inadequada. Também podem ser indicadores de contaminação pós-confeção em alimentos pasteurizados, porque são facilmente destruídos pelo calor e como tal não devem sobreviver ao tratamento térmico. A *E.coli* é um indicador de contaminação fecal em alimentos “in natura” (Schuh et al. 2015).

4.3.2. Coliformes fecais e *Escherichia coli*

O grupo dos coliformes termotolerantes ou coliformes fecais é um subgrupo dos coliformes totais, restrito aos membros capazes de fermentar a lactose em 24 ou 48 horas, com produção de gás, se mantidos a 44,5 – 45,5°C (Ferreira et al. 2014; Schuh et al. 2015). Assim, este grupo é constituído maioritariamente por *Escherichia coli*, por alguns biótopos de *Enterobacter* e ocasionalmente por algumas espécies de *Klebsiella* (Fresco 2004).

Os critérios microbiológicos que envolvem a *Escherichia coli* são úteis quando é desejável determinar se houve contaminação fecal. Uma vez que este microrganismo vive durante pouco tempo fora do ambiente entérico, a sua presença nos alimentos indica contaminação recente (Ferreira et al. 2014).

II. Material e métodos

1. Introdução

O presente estudo foi conduzido em quinze estabelecimentos de restauração do concelho de Lisboa e foi realizado em duas vertentes. A primeira vertente do estudo consistiu numa auditoria higio-sanitária interna do estabelecimento. Como instrumento de avaliação utilizou-se uma lista de verificação, que tem como referencial as disposições legais em matéria de higiene alimentar e permite observar e monitorizar as condições de fabrico no estabelecimento durante o período de laboração. A outra vertente consistiu na realização de análises microbiológicas a amostras recolhidas de alimentos prontos a consumir e realizadas no Laboratório de Microbiologia Alimentar da Faculdade de Medicina Veterinária. A recolha dos dados da lista e a realização das análises microbiológicas ocorreram nos meses de janeiro e fevereiro de 2011.

O objetivo deste estudo foi avaliar as condições higio-sanitárias dos estabelecimentos de restauração, desde as matérias-primas até ao produto final pronto a consumir, por avaliação da qualidade microbiológica e a segurança dos produtos neles produzidos.

2. Realização da Lista de Verificação

A lista de verificação elaborada consistiu em cinco grupos de questões, referentes a práticas de fabrico e armazenamento, instalações, controlo de processos, higiene pessoal e existência do sistema HACCP (Tabela 5).

A lista de verificação incidia sobre as possíveis fontes de contaminação dos alimentos nomeadamente as matérias-primas, metodologias de processamento alimentar, condições higiénicas de fabrico e manipulação dos alimentos e armazenagem dos géneros alimentícios crus e cozinhados.

A realização da auditoria interna aos estabelecimentos de restauração foi pós-laboração, depois das horas do serviço de almoços, sempre após as 14 horas. A cada questão verificada afirmativamente era atribuído 1 ponto e no caso de não ser verificado atribuía-se o valor 0. O grupo referente a práticas de fabrico e armazenamento consistia em 13 questões o que perfaz uma nota máxima de 13 pontos, o grupo de instalações perfaz 6 pontos, o grupo de controlo de processos 8 pontos, higiene pessoal 4 e o sistema HACCP 3, o que dará uma nota máxima de 34 pontos.

Tabela 5 - Lista de verificação utilizada na auditoria

1.1	Número de funcionários:		
		Sim	Não
1.2	Práticas de fabrico e armazenagem		
1	Temperatura adequada dos equipamentos de frio		
2	Acondicionamento adequado de produtos		
3	Estiva adequada de produtos		
4	Alimentos dentro do prazo de validade		
5	Preparação dos produtos de natureza diferente separada temporalmente ou espacialmente		
6	Higienização adequada de hortofrutícolas consumidos crus		
7	Descongelação adequada		
8	Manipulação de produtos confeccionados separada temporal ou fisicamente		
9	Temperatura e quantidade de CPT** adequadas		
10	Metodologia de arrefecimento adequada		
11	Existe equipamento próprio para arrefecimento		
12	Metodologia de pós-confeção adequada		
13	Utilização de ovos pasteurizados em preparações frias		
1.3	Instalações		
14	Existe uma zona de armazenamento separada		
15	Existem zonas de preparação separadas por tipo de produto		
16	Zona de manipulação de confeccionados separada		
17	Higiene adequada das instalações, equipamentos e utensílios		
18	Estado de conservação adequado das instalações, equipamentos e utensílios		
19	Layout e dimensões das instalações adequados		
1.4	Controlo de processos		
20	Os fornecedores entregam MP* no estabelecimento		
21	Existe alguma metodologia de controlo de fornecedores (análises, auditorias, certificados HACCP)		
22	Estão definidos procedimentos e parâmetros de controlo de receção de MP* e são cumpridos		
23	Estão definidos procedimentos e parâmetros de controlo de armazenamento de MP* e são cumpridos		
24	Estão definidos procedimentos e parâmetros de controlo de confeção e são cumpridos		
25	Estão definidos procedimentos e parâmetros de controlo de óleos de fritura e são cumpridos		
26	Estão definidos procedimentos e parâmetros de controlo de arrefecimento e são cumpridos		
27	Estão definidos procedimentos e parâmetros de controlo de pós-confeção e são cumpridos		
1.5	Higiene pessoal		
28	Todo o pessoal tem formação em HSA***		

29	Comportamentos e higiene do pessoal adequados		
30	Fardamento adequado e em bom estado de higiene		
31	Medicina no trabalho atualizada		
1.6	Sistema HACCP		
32	Existe um plano plano de autocontrolo baseado nos princípios HACCP		
33	Plano de autocontrolo baseado nos princípios HACCP é cumprido		
34	Responsáveis conhecem conteúdos do plano de autocontrolo baseado nos princípios HACCP		

* Matérias-primas

** Compostos Polares Totais

***Higiene e Segurança Alimentar

3. Análises microbiológicas dos alimentos

3.1. Avaliação da qualidade microbiológica e segurança

As determinações microbiológicas foram selecionadas de acordo com a composição e tipo de processamento dos alimentos estudados e os microrganismos potencialmente patogénicos geralmente associados a esses produtos. Refletem a qualidade microbiológica dos alimentos em relação à vida de prateleira ou à segurança para o consumidor, neste caso, devido à presença de agentes patogénicos alimentares (Ferreira et al. 2014). A maior aplicação dos microrganismos indicadores consiste na avaliação da qualidade global de um alimento e das condições de higiene durante o seu processamento.

3.1.1. Amostragem

O plano de amostragem foi delineado com a finalidade de analisar as tendências dos produtos de um ponto de vista global, com vista a fornecer informações sobre a qualidade e segurança microbiológica do produto final. Por conseguinte, as análises microbiológicas foram realizadas numa perspetiva de monitorização e verificação das condições higio-sanitárias e de processamento do género alimentício.

O objetivo foi determinar o tipo e teores dos diversos microrganismos presentes na amostra e fazer a posterior comparação com os valores guia admitidos para esses produtos. A avaliação produzida permitiu verificar se as boas práticas de fabrico e o sistema de autocontrolo baseado nos princípios HACCP estavam a ser eficazes.

A amostra deve chegar ao laboratório com as características microbiológicas perfeitamente inalteradas em relação às existentes aquando da recolha. Devem ser tomadas

medidas apropriadas para evitar a contaminação da amostra e/ou a multiplicação ou destruição microbiana durante a colheita, transporte e conservação, até ao momento da análise. A amostra colhida deve ser colocada em mala isotérmica previamente refrigerada, com termoacumuladores, para que seja transportada a uma temperatura entre 1°C e 8°C, e deve ser transportada para o laboratório o mais rapidamente possível. A análise deve ser iniciada no período máximo de 24 horas após a recolha (INSA [date unknown]).

As amostras foram colhidas entre as 14 e 15 horas nas cozinhas dos estabelecimentos de restauração, sendo colocadas em sacos de recolha de amostra esterilizados de fecho hermético com o auxílio de espátulas desinfetadas. O transporte das amostras foi feito higienicamente numa mala isotérmica com termoacumuladores, e depois foram colocadas no frigorífico, na prateleira superior, afastadas da parede. As análises foram realizadas no dia seguinte, pelas 9 horas.

3.1.2. Preparação de amostra para análise microbiológica e diluições decimais seriadas (ISO 6887 – 2: 2017)

As amostras devem ser manipuladas de modo a evitar a sua contaminação quer pelos operadores quer a partir do meio ambiente que as rodeia. A manipulação das amostras foi efetuada junto a um bico de Busen, utilizando uma espátula esterilizada.

Para alimentos sólidos, para a pesquisa de microrganismos potencialmente patogénicos, o esquema de preparação padrão corresponde a pesar 25 g de amostra obtidas pela recolha aleatória e assética de várias alíquotas do alimento para um saco de Stomacher e adicionar 225 ml de um soluto diluidor e homogeneizar. Obtém-se, assim, a suspensão inicial correspondente à diluição 10^{-1} . Para a contagem de outros microrganismos, não patogénicos, usa-se o mesmo processo mas pesando apenas 10 g de amostra a que se adicionam 90 ml de soluto diluidor.

Para a mesma amostra, foram realizadas duas colheitas de 25 g, uma para pesquisa de *Salmonella* spp., e outra para pesquisa de *Listeria monocytogenes*, e ainda uma de 10 g para as restantes determinações.

Seguidamente, foram preparadas diluições decimais seriadas a partir da suspensão inicial. Por cada amostra foram realizadas as diluições consideradas necessárias para que fosse possível obter o número apropriado de microrganismos para a contagem em placa de Petri, em meio de cultura sólido, utilizando a técnica de sementeira por incorporação.

3.1.3. Contagem de microrganismos

3.1.3.1. Contagem de aeróbios mesófilos a 30°C (NP 4405: 2002)

Para a contagem total de microrganismos aeróbios a 30°C utilizou-se a metodologia descrita na Norma Portuguesa NP 4405 (2002), consistindo em semear, em placa de Petri e por incorporação, 1 ml de inóculo ao qual foram adicionados cerca de 15 ml de meio PCA (Plate Count Agar, Sharlau) previamente fundido, e arrefecido a aproximadamente 48-50°. As placas foram incubadas em estufa a 30°C durante 24 a 48 horas, após o que se procedeu à leitura dos resultados, os quais foram expressos em logUFC/g.

3.1.3.2. Contagem de *Enterobacteriaceae* (ISO 21528-2: 2004)

De acordo com o preconizado na norma ISO 21528-2: 2004, retirou-se 1 ml de inóculo das diluições julgadas convenientes e realizou-se a sementeira, por incorporação em placa de Petri, utilizando o meio VRBD (VRBD, Sharlau). Após solidificação do meio, foram colocadas as placas semeadas na estufa a 37°C durante 24 horas. O resultado da contagem das colónias características, foi exposto em logUFC/g.

3.1.3.3. Contagem de *Escherichia coli* (NP 4396:2002)

Foi efetuada a sementeira por incorporação de 1 ml de inóculo de cada uma das diluições em meio de cultura Tergitol (Biokar diagnostics, França). A contagem de colónias características (coloração azul turquesa) foi efetuada após incubação a 44,5°C durante 24 horas. Os resultados foram expressos em logUFC/g.

3.1.4. Pesquisa de microrganismos

3.1.4.1. Pesquisa de *Salmonella* spp. (ISO 6579-1:2002) em 25g

Por cada amostra, depois de ser recolhido 1 ml de suspensão da diluição 10⁻¹ para a correspondente placa de Petri, o saco de Stomacher com o meio de pré-enriquecimento, água peptonada tamponada, foi a incubar a 37°C durante 24 horas.

1) Meio de enriquecimento seletivo

Após a incubação anterior, transferiu-se 0,1 ml do inóculo para um tubo com 10 ml de Caldo de Rappaport Vassiliadis com soja (RVS). Seguiu-se uma incubação a 42°C durante 24 horas.

Da mesma suspensão-inicial foram retirados 10 ml de inóculo que se colocaram num tubo com 10 ml de Caldo Muller-Kauffmann tetracionato-novobiocina (MKTTn) e seguiu-se a incubação a 37°C durante 24 horas.

2) Isolamento em meio seletivo

De ambos os tubos retiraram-se 100 µl com uma ansa, que se semearam por estria com esgotamento para placas de agar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e placas de agar entérico de Hektoen (Scharlau). As placas semeadas foram colocadas em estufa a 37°C durante 24 horas.

Depois do período de incubação as placas devem ser observadas para verificar a existência de colônias suspeitas. No meio Hektoen as colônias suspeitas são verdes ou verdes com centro negro, no meio XLD agar as colônias são vermelhas, transparentes ou com halo vermelho. Em caso da existência de colônias suspeitas, estas devem ser repicadas para Triple Sugar Iron Agar (TSI, Oxoid, meio inclinado num tubo de ensaio) por picada no fundo e estria na rampa. Na verificação do tubo TSI, considera-se que a amostra é positiva se o fundo estiver vermelho, o bisel amarelo, podendo ocorrer ou não produção de gás e enegrecimento do meio. Posteriormente faz-se o isolamento em Triptona soja agar (TSA) que incuba a 37°C durante 24 horas, procedendo-se depois à realização de provas bioquímicas com o API®20E para identificação da espécie.

3.1.4.2. Pesquisa de *L. monocytogenes* (ISO/DIS 11290-1:1996) em 25g

a) Meio de enriquecimento seletivo

Depois da incubação da suspensão-inicial com meio de pré-enriquecimento Frazer I, foi retirado 1 ml de inóculo e colocado num tubo de ensaio com 10 ml de Frazer II, o qual depois foi a incubar a 37°C durante 24 horas.

b) Isolamento em meio seletivo

Da mesma suspensão-inicial retirou-se, com o auxílio de uma ansa, o inóculo e espalhou-se por esgotamento em placa de Petri com meio sólido de Oxford (Modified Oxford Medium). Seguiu-se a incubação a 37°C durante 24 horas.

Depois da incubação em Frazer II foi retirado desta suspensão com uma ansa, o inóculo, e semeado por estria, com esgotamento, em placas com meio sólido Oxford. As placas semeadas foram colocadas na estufa a 37°C durante 24 horas.

Nos dois casos, após a incubação as placas foram observadas quanto à existência de colônias suspeitas que são pretas e concavas. No caso de serem observadas colônias suspeitas devem ser repicadas para placas com meio TSA e incubadas a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, deve observar-se as colônias efetuando o seu estudo por transiluminação de Henry, e nas que apresentem uma luminescência azul efetuar o teste da catalase e da oxidase, e depois realizar provas bioquímicas com API®Listeria a partir das colônias catalase positiva e oxidase negativa.

3.2. Avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos prontos para consumo

Os alimentos prontos para consumo, abrangidos nos “Valores-guia INSA” são produtos no momento da distribuição, isto é, tal como são servidos ao consumidor final e com um curto período de vida útil estabelecido para o consumo. A amostra colhida para análise deve incluir todos os componentes constituintes do prato, na mesma proporção e nas mesmas condições em que são servidos. Caso a junção de produtos hortícolas crus ou frutos crus a um prato composto por alimentos totalmente cozinhados/pasteurizados seja realizada no momento da entrega ao consumidor final, os dois componentes devem ser colhidos e analisados separadamente (INSA 2019).

Os “Valores-guia INSA” identificam 4 Grupos de alimentos prontos para consumo. Os Grupos estão organizados da seguinte forma (INSA 2019):

Grupo 1 – Alimentos que sofreram tratamento térmico;

Grupo 2 – Alimentos compostos de alimentos totalmente cozinhados/pasteurizados, adicionados de componentes crus, ou carne ou peixe cru, prontos para consumo;

Grupo 3 – Frutos e produtos hortícolas crus;

Grupo 4 – Alimentos ou seus componentes contendo flora específica própria.

Estes 4 Grupos foram por sua vez subdivididos em Subgrupos de acordo com o nível de manuseamento após a confeção, o tipo e proporção de componentes e a população a que se destinam. Nas tabelas 6 e 7 mostram-se as divisões do Grupo 1 e Grupo 2 em Subgrupos.

Tabela 6 – “Valores-guia INSA” – Grupo 1 e Subgrupos de alimentos prontos para consumo (adaptado de INSA 2019).

Grupo 1 – alimentos que sofreram tratamento térmico		
Subgrupo	Categoria de alimentos	Exemplos
1A	Alimentos totalmente cozinhados, não manuseados após o tratamento térmico: estão incluídos os alimentos fracionados em porções individuais e os que levam cobertura colocada em quente. Alimentos reconstituídos a partir de um produto desidratado, com exceção das FDL.	Pratos/aperitivos, servidos quentes – pratos servidos quentes sopas, alimentos de <i>Cook-chill</i> e <i>Cook-freeze</i> , após o reaquecimento/regeneração. Pratos/aperitivos, servidos frios – bolinhos/pastéis de bacalhau, bolas de bacalhau/carne, croquetes, empadas, filetes de peixe, folares, panados, pastéis de carne/marisco/peixe, pizzas, quiches/tartes salgadas, rissóis. Pastelaria e sobremesas – aletria, arroz doce, leite-creme e tapioca sem canela, biscoitos e bolachas, bolo de chocolate com e sem cobertura, compotas, croissants, frutas assadas ou cozidas, gelatinas, mousses instantâneas, pastéis de nata, pudins, queques, tarts de maçã.
1B	Alimentos totalmente cozinhados, manuseados após o tratamento térmico – estão incluídos os alimentos adicionados de componentes processados, com baixo pH ou baixo a_w , como açúcar em pó, coco ralado, especiarias, frutos secos, maionese, mel, ketchup, xaropes de vários tipos como	Pratos/aperitivos, servidos frios – crepes com recheio, salada russa com maionese, saladas frias de arroz/batata/massa, produtos hortícolas cozinhados com delícias do mar/atum/bacalhau/frango/pato/peixe desfiados e/ou frutos secos, amêndoas, nozes e pinhões.

	de caramelo, de chocolate ou de frutas, congelados.	Alimentos de <i>Cook-chill</i> e <i>Cook-freeze</i> , antes do reaquecimento/regeneração. Crustáceos e moluscos bivalves cozidos. Pastelaria e sobremesas – aletrias, arroz doce, leite-creme e tapioca com canela, bolas de Berlim, éclaires, bavareses, cheesecake e gelados com natas ultrapasteurizadas (UHT). Crepes com recheio e/ou cobertura, mousse de bolachas/biscoitos, rolo/torta de laranja, saladas de fruta em calda, salame de chocolate. Sandes – cachorro, hambúrguer no pão, prego no pão, sandes de atum/carne assada/panado. Bebidas - tisanas/chás com aromas.
1C	Alimentos com componentes totalmente cozinhados adicionados de componentes pasteurizados conservados em refrigeração – não incluídos no grupo 1B.	Pratos/aperitivos, servidos frios – fiambres/mortadelas fatiados, saladas frias de arroz/massa com fiambre. Pastelaria e sobremesas – Gelados preparados com natas frescas, tartes com natas frescas, pastéis recheados com natas frescas. Sandes – sandes de fiambre/mortadela/queijo flamengo.
1D	Fórmulas desidratadas para lactentes (FDL) reconstituídas.	FDL reconstituídas, em biberão ou em copo.

Tabela 7 – “Valores-guia INSA” – Grupo 2 e Subgrupos de alimentos prontos para consumo (adaptado de INSA 2019).

Grupo 2 – Alimentos compostos de alimentos totalmente cozinhados/pasteurizados, adicionados de componentes crus ou carne ou peixe crus, prontos para consumo.		
Subgrupo	Categoria de alimentos	Exemplos
2A	Alimentos compostos – estão incluídos os alimentos totalmente cozinhados adicionados de frutos/produtos hortícolas crus em que os crus constituem apenas um apontamento, ou estavam congelados.	Pratos/aperitivos – pratos cozinhados decorados com leves apontamentos de produtos hortícolas frescos (coentros, salsa, hortelã, manjerição) ou frutos (morango ou rodela de laranja/limão/tomate). Sobremesas – gelados de fruta. Bebidas – batidos de fruta congelada.
2B	Alimentos compostos – estão incluídos os alimentos totalmente cozinhados ou pasteurizados, adicionados de frutos crus com ou sem molhos.	Pastelaria e sobremesas – Bolos/pastéis/tartes contendo fruta fresca, saladas de frutas com mistura de fruta fresca e fruta em calda. Sandes – sandes contendo produtos hortícolas (alface, cebola, cenoura, tomate, rúcula) frescos.
2C	Alimentos compostos – estão incluídos os Alimentos totalmente cozinhados ou pasteurizados, adicionados de produtos hortícolas crus podendo incluir frutos crus.	Pratos/aperitivos – prato de carne/peixe/ovos contendo mistura de vegetais ou frutos crus. Paté de atum/camarão/delícias do mar com cebola, húmus, salada de feijão-frade com salsa, cebola e ovo cozido, saladas mistas compostas de alimentos cozinhados e vegetais crus.

		Sandes – sandes contendo produtos hortícolas (alface, cebola, cenoura, tomate, rúcula) frescos.
2D	Alimentos compostos e/ou com queijo (fabricado com leite cru), carne/peixe crus.	Pratos/aperitivos – Sushi, Sashimi, Nigiri, Maki, Ceviche, Tártaro e Carpaccio de peixe/carne. Sandes – sandes de chouriço/presunto/salmão fumado com ou sem alface, cebola, tomate.

Os “Valores-guia INSA” aplicam-se a amostras únicas (valor n=1) e o objetivo não é a avaliação de lotes nem o controlo oficial. Estes limites foram estabelecidos para serem aplicados em programas de vigilância microbiológica do sistema de segurança alimentar implementado ou estudos de monitorização, não estando associados a um plano de amostragem formal (INSA 2019).

A interpretação de resultados obtidos nos ensaios microbiológicos em alimentos prontos para consumo, depende do número de unidades formadoras de colónias (ufc) por g ou ml da amostra analisada e/ou da deteção ou não de microrganismos patogénicos e/ou toxinas e, são classificados (Tabela 8) em três níveis (INSA 2019):

- Satisfatório – o resultado analítico encontra-se dentro dos valores previstos, ou seja, inferior ou igual ao Valor Máximo de Referência (VMR);
- Questionável – o resultado analítico é superior ao VMR e inferior ou igual ao Valor Máximo Admissível (VMA) e indica que há probabilidade de existirem falhas nos processos. Recomenda-se que seja efetuada uma análise de causas, de forma a esclarecer a causa provável;
- Não satisfatório e Não satisfatório/potencialmente perigoso – o resultado analítico é superior ao VMA e indica que há falhas nos processos. Deve ser efetuada uma análise de causas, de forma a esclarecer a causa provável.

O estabelecimento de um plano de amostragem permite que a probabilidade de detetar processos não conformes, aumente à medida que aumenta o número de unidades analisadas, esquematizando a classificação do nível de qualidade microbiológica dos géneros alimentícios.

Tabela 8 – “Valores-guia INSA” – interpretação da qualidade microbiológica (adaptado de INSA 2019).

Nível da qualidade microbiológica	
Alimentos prontos para consumo	Satisfatório: todos os resultados de todos os parâmetros são satisfatórios.
	Questionável: um ou mais do que um parâmetro com resultado questionável.

	Não satisfatório: um ou mais do que um parâmetro com resultado não satisfatório.
	Não satisfatório/potencialmente perigoso: um ou mais do que um parâmetro com resultado não satisfatório/potencialmente perigoso.

A vigilância microbiológica é uma ferramenta importante na verificação e validação dos processos e no controlo dos processos e dos prazos estabelecidos para consumo, tratando-se de uma avaliação de desempenho através da comparação dos resultados de ensaios microbiológicos face a “Valores-guia” previamente estabelecidos. Na Tabela 9 estão esquematizados os “Valores-guia” para os diferentes grupos de alimentos prontos a consumir.

Tabela 9 – “Valores-guia INSA” – microrganismos indicadores de higiene e de alteração e, patogénicos em alimentos prontos para consumo (adaptado de INSA 2019).

Microrganismos indicadores de higiene e de alteração	Grupos e Subgrupos	Resultado Contagens (ufc/g ou ufc/ml)		
		Satisfatório	Questionável	Não satisfatório
Microrganismos a 30°C/contagem de aeróbios mesófilos	1A, 1D*	$<10^3$	$10^3 \leq 10^4$	$>10^4$
	1B, 2A	$<10^4$	$10^4 \leq 10^5$	$>10^5$
	1C, 2B	$<10^5$	$10^5 \leq 10^6$	$>10^6$
	2D	$<10^6$	$10^6 \leq 10^7$	$>10^7$
	2C	$<10^6$	$10^6 \leq 10^8$	$>10^8$
<i>Enterobacteriaceae</i> a 37°C	1A, 1B	$<10^2$	$10^2 \leq 10^3$	$>10^3$
	1D	Não detetado em 10 ml ou 10 g**	Detetado em 10 ml ou 10 g e $\leq 10^2$	$>10^2$
	2A	$<10^3$	$10^3 \leq 10^4$	$>10^4$
	1C, 2B, 2C, 2D	$<10^4$	$10^4 \leq 10^5$	$>10^5$
<i>Escherichia coli</i>	1	<10 (não detetado)	Não aplicável	>10
	2, 3	<10 (não detetado)	$10 \leq 10^2$	$>10^2$
<i>Listeria monocytogenes</i>	Todos os grupos	Não detetado	-	Detetado
<i>Salmonella</i> spp.	Todos os grupos	Não detetado	-	Não aplicável

*aplicável quando a flora específica interfere neste ensaio

**sempre que se detetem *Enterobacteriaceae* a amostra deve ser submetida a testes para deteção de *Cronobacter* spp.

Para os valores guia dos aeróbios mesófilos a 30°C, *Enterobacteriaceae* e *Escherichia coli*, não há qualquer documento legal de referência, pelo que são utilizados os valores guia apresentados pelo laboratório de referência do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA 2019).

III. Resultados e Discussão

As doenças transmitidas por alimentos são associadas ao consumo de alimentos e água contaminados por microrganismos potencialmente patogénicos. Alguns destes agentes, que podem ser fungos, bactérias, protozoários ou vírus, são utilizados como indicadores das condições higio-sanitárias em que os géneros alimentícios são produzidos (Silveira et al. 2019).

Ainda que dependendo do agente, os sintomas mais comuns são alterações gastrointestinais incluindo dor de estômago, náuseas, vômitos, diarreia e, por vezes, febre. Na maioria dos casos, a duração dos sintomas pode variar de poucas horas até mais de cinco dias, dependendo do estado físico do paciente, do tipo de microrganismo ou toxina ingerida ou da quantidade presente no alimento. Conforme o agente etiológico envolvido, o quadro clínico pode ser mais grave e prolongado, apresentando desidratação grave, diarreia sanguinolenta, insuficiência renal aguda e insuficiência respiratória (Oliveira et al. 2010).

Por vezes os estabelecimentos de restauração estão implicados nos surtos de origem alimentar, sendo apontados como origem de um problema de saúde pública. Assim, torna-se necessário o fornecimento de informações relacionadas com a qualidade dos alimentos, a fim de garantir políticas para a segurança dos alimentos fornecidos (Silveira et al. 2019).

A indústria alimentar é particularmente sensível no que respeita às operações de limpeza e desinfecção, dado que os elevados teores de matéria orgânica suscetíveis de se acumularem nas superfícies e nos utensílios que contactam com os alimentos, constituem um meio ótimo para o desenvolvimento microbiano e as condições necessárias ao crescimento dos microrganismos estão sempre presentes (Moore and Griffith 2002).

Para que não ocorra contaminação dos alimentos, com a consequente diminuição da sua qualidade ou do seu prazo de validade, é fundamental que a higienização do ambiente de trabalho, superfícies, equipamentos e utensílios seja adequada. Para a higienização eficaz devem ser considerados aspetos como o tipo de sujidade a ser removida (orgânica e inorgânica), os materiais usados nos pavimentos, paredes e tetos das instalações, o tipo de superfície e equipamento a higienizar, a qualidade da água usada, entre outros. É ainda de considerar a correta seleção do detergente, uma vez que não terão igual eficácia sobre todos os tipos de sujidade (Noronha [date unknown]).

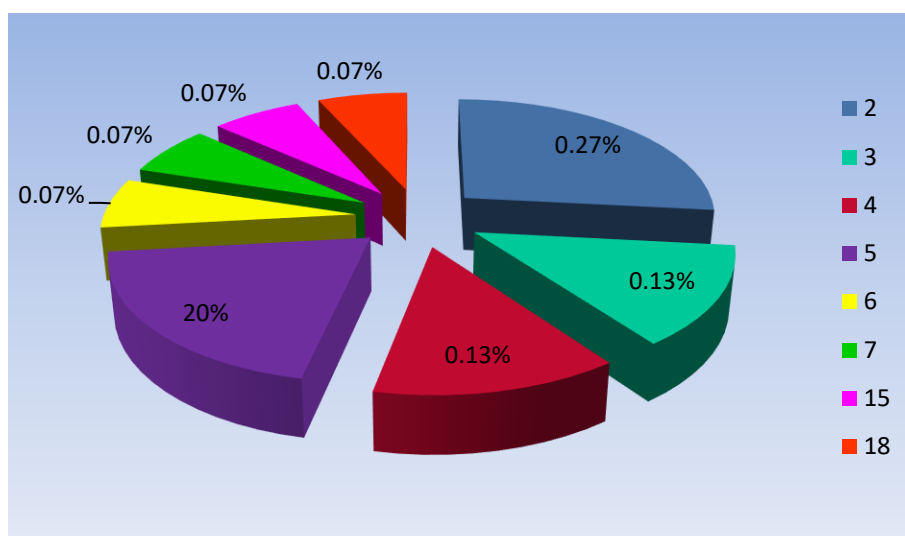
1. Caracterização da amostra

1.1. Caracterização dos estabelecimentos de restauração

Os estabelecimentos de restauração constantes do estudo estão localizados no concelho de Lisboa. A grande maioria (73,3%) emprega até 5 funcionários, sendo que os

restantes 26,7% possuem mais de 5 funcionários. A média aritmética do número de funcionários é de 5,5 por estabelecimento de restauração. Do total, o número de funcionários mais frequente é 2 e 5 com uma percentagem de 26,7% e 20%, respetivamente, de estabelecimentos. O Gráfico 1 ilustra a percentagem de estabelecimentos com o respetivo número de funcionários.

Gráfico 1 – Número de funcionários por valores percentuais de estabelecimentos.

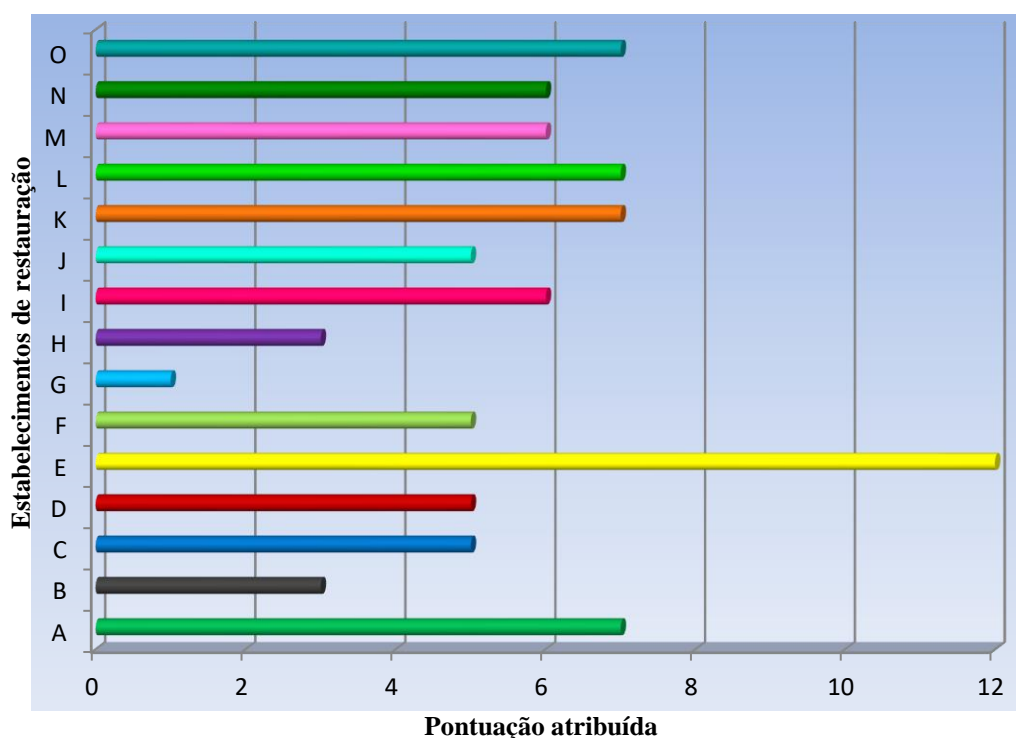


1.2. Práticas de fabrico e armazenamento

Os estabelecimentos de restauração que fazem parte da amostra foram verificados e pontuados em vários itens tidos como fundamentais para assegurar a qualidade e segurança dos alimentos (Gráfico 2).

Verificou-se que a maioria (67%) dos estabelecimentos não assegura uma temperatura de refrigeração adequada para o armazenamento de produtos refrigerados (<4°C), no entanto, a mesma percentagem apresentava um acondicionamento conveniente dos produtos alimentares em refrigeração. Já a estiva dos produtos em refrigeração em 67% dos estabelecimentos não estava devidamente organizada, no entanto, todos os produtos existentes estavam dentro do prazo de validade.

Gráfico 2 – Pontuação atribuída a cada estabelecimento de restauração.



O processo de conservação em refrigeração baseia-se na diminuição da atividade dos microrganismos presentes nos alimentos e das suas enzimas, pela ação do frio. Para uma conservação bem-sucedida em refrigeração, com temperaturas entre 1°C e 4°C, devem ser cumpridas várias regras, nomeadamente, garantir a higiene adequada dos equipamentos, garantir que os alimentos estão devidamente acondicionados em embalagens com tampa ou cobertos com película aderente, garantir que não são colocados alimentos quentes na câmara frigorífica, e garantir a disposição dos alimentos no interior da câmara, da prateleira superior para a inferior: alimentos cozinhados, as carnes e peixes crus, os vegetais nas prateleiras inferiores ou apropriadas e os produtos em descongelação na parte inferior (Baptista and Linhares 2005).

A preparação de produtos de naturezas diferentes é, maioritariamente (73,3%), separada temporal ou fisicamente e, destes apenas 9% têm separação física. Nas zonas de preparação de alimentos, as operações devem estar devidamente organizadas de modo a que a preparação ocorra sem pôr em causa a segurança e higiene dos alimentos, já que normalmente ocorre à temperatura ambiente, sendo igualmente propícia a contaminações cruzadas. Os alimentos deverão permanecer na “zona de perigo” (entre 4°C e 63°C) o menor tempo possível, pelo que a tarefa deve ser realizada rapidamente e sem interrupções.

Para evitar a contaminação dos alimentos confeccionados e pré-confeccionados, por contacto direto ou indireto com o pessoal ou matérias-primas, as operações devem ser organizadas de forma a seguir o sistema de “marcha em frente”, cumprindo a sequência

preparação e serviço, sem que haja retrocessos ou cruzamentos, nunca permitindo que os alimentos prontos a consumir se cruzem com os alimentos crus (Baptista and Linhares 2005).

A higienização dos alimentos consumidos crus (hortofrutícolas) não é realizada de maneira apropriada na maioria dos estabelecimentos (86,7%). Estes utilizam com frequência água e vinagre, que apenas elimina os pequenos animais como insetos e lagartas, mas que não reduz ou elimina os microrganismos que possam estar presentes neste tipo de produtos.

A maior parte das intoxicações alimentares resulta de procedimentos de higienização incorretos na preparação e manipulação dos alimentos. Alguns destes produtos não sofrem qualquer processamento térmico, sendo consumidos crus ou apenas temperados. Assim, todos os produtos hortícolas a servir crus, incluindo ervas aromáticas como salsa, coentros e hortelã, têm que ser bem lavados e desinfetados (APHORT [date unknown]).

Os frutos devem ser cuidadosamente lavados, de modo a remover a sujidade e possíveis contaminantes. Preferencialmente os frutos devem ser consumidos sem casca, devido à possível presença de pesticidas. A preparação de sumos deverá ser realizada no momento do seu consumo, evitando assim a perda de nutrientes como vitaminas, e possíveis alterações organoléticas (Baptista and Linhares 2005).

A descongelação dos géneros alimentícios, na maioria dos restaurantes avaliados (67%) é feita adequadamente. Os alimentos devem estar bem descongelados antes da confeção, uma vez que se forem cozinhados sem estarem bem descongelados, pode acontecer que a temperatura no seu interior não atinja valores seguros.

Os produtos devem ser descongelados em ambiente refrigerado, a temperaturas entre 1°C a 4°C e nunca à temperatura ambiente. Se os alimentos forem descongelados à temperatura ambiente, há heterogeneidade no estado de congelação entre a parte interna e a externa da peça. Enquanto a parte exterior está a uma temperatura da “zona de perigo” além de ter já disponibilidade de água propícia para a multiplicação rápida das bactérias, a parte interior poderá demorar algumas horas até estar totalmente descongelada. Também é importante que não se proceda à recongelação de alimentos que tenham sido descongelados, pois o aumento da temperatura permite a multiplicação de microrganismos que podem atingir níveis inaceitáveis e porem em causa a segurança do consumidor (Baptista and Linhares 2005).

A temperatura utilizada na fritadeira e a quantidade de corpos polares totais no óleo de fritura eram adequados na maioria (67%) dos estabelecimentos. Os óleos de fritura em uso, quando não controlados, podem constituir um risco para a saúde uma vez que se degradam por ação do calor e do período de tempo a que se encontram expostos a determinada temperatura (Baptista and Linhares 2005). O seu controlo pode ser feito de forma mais ou menos empírica pela observação das características organoléticas, como o cheiro, a

viscosidade, a cor, a libertação de fumos ou a formação de espuma, ou ainda pelo recurso a testes colorimétricos que avaliam o teor em compostos polares presentes (Pereira 2009).

A Portaria nº1135/95 estabelece regras a observar na utilização de gorduras e óleos comestíveis de fritura, referindo que a temperatura a que estes produtos são sujeitos não deverá ultrapassar os 180°C e que o teor em compostos polares não pode ser superior a 25%. O óleo de fritura deverá ser substituído regularmente, e quando tiver uma tonalidade escura, odor ou formação de espuma, pois durante as sucessivas frituras formam-se compostos tóxicos (Baptista and Linhares 2005). Os óleos mais apropriados para a fritura são o óleo de palma, o óleo de bagaço de azeitona e o óleo de amendoim, pois suportam temperaturas superiores a 180°C (Baptista and Linhares 2005).

Em contrapartida a metodologia de arrefecimento adequada só era aplicada em 7% dos restaurantes, com a grande maioria (93%) a não cumprir um arrefecimento apropriado; apenas um restaurante possuía abatedor de temperatura. A característica fundamental do arrefecimento é ter de ser o mais rápido possível, de modo a manter uma boa qualidade física (odor, cor, sabor e textura) e microbiológica dos alimentos. Para tal, é necessário que se alcance uma temperatura igual ou inferior a 10°C em menos de duas horas. Um arrefecimento lento expõe o alimento a um longo período de tempo a temperaturas ótimas de crescimento bacteriano, podendo atingir níveis elevados de carga microbiana que podem pôr em causa a segurança do consumidor. É recomendado o uso de células de arrefecimento rápido como o abatedor de temperatura, que são equipamentos que arrefecem os alimentos desde a temperatura de confeção à de refrigeração num curto espaço de tempo. Na maioria dos estabelecimentos de restauração não existe este equipamento, e assim o arrefecimento deve ser feito em banho de água gelado, com os alimentos dentro do recipiente onde vão ser conservados em refrigeração, devidamente tapado e acondicionado (Baptista and Linhares 2005). Deve ter-se em consideração que o arrefecimento é mais rápido se o alimento for dividido em porções, assim como alimentos mais densos demoram mais tempo a arrefecer (APHORT [date unknown]).

Os 7% dos estabelecimentos que aplicavam uma metodologia de pós-confeção adequada, incluíam o arrefecimento rápido de sobras ou a manutenção a quente até à hora de servir. Em nenhum dos estabelecimentos de restauração são utilizados ovos pasteurizados em preparações sem tratamento térmico.

1.3. Instalações

Todos os estabelecimentos de restauração têm uma zona de armazenamento para as matérias-primas separada fisicamente da cozinha. Apenas 1 estabelecimento (7%) tinha zonas de preparação separadas fisicamente por tipo de alimentos crus como carnes, pescado, hortofrutícolas ou ovos, e alimentos confeccionados, no entanto, a maioria (80%) tem duas

zonas de manipulação de alimentos separadas, uma para alimentos crus e outra confeccionados. Os restantes 20% a separação entre alimentos crus e confeccionados é feita temporalmente.

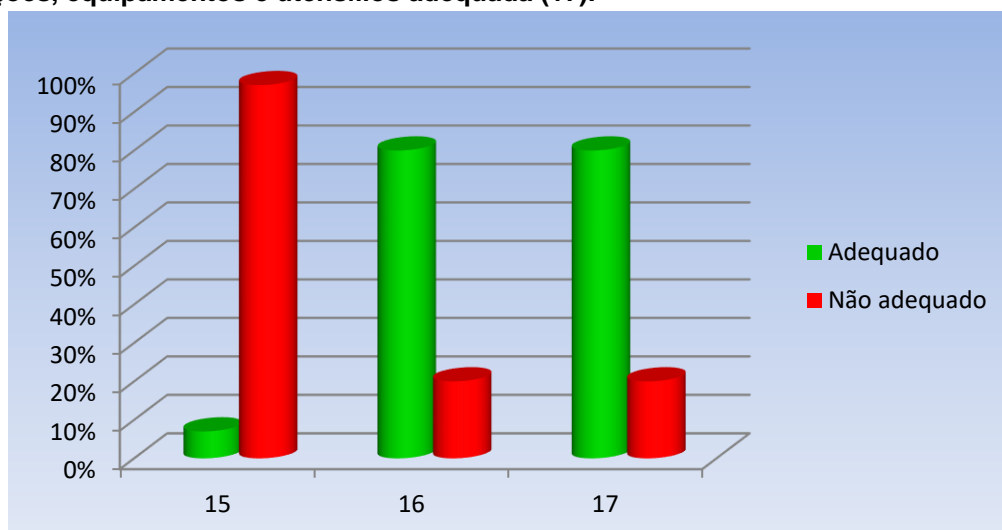
Os alimentos crus devem ser manipulados em zonas diferentes daquelas onde se manipulam os alimentos confeccionados. Em situações em que não é possível a separação física, deve ser feita a separação temporal, intercalada por lavagem e desinfecção da zona comum. Todo o material que contacte com alimentos crus ou potencialmente contaminados deve ser limpo e desinfetado após a sua utilização. Após a preparação, se estes alimentos não forem logo utilizados deverão ser armazenados, sendo a temperatura aconselhada entre 1°C a 4°C (Baptista and Linhares 2005).

Quando os alimentos são manipulados de uma forma incorreta pode resultar em contaminações cruzadas que colocam em risco a saúde do consumidor. A contaminação cruzada consiste na transferência de substâncias ou microrganismos prejudiciais à saúde humana, de uma fonte contaminada, alimentar ou não, para um alimento não contaminado ou pronto para consumo.

Os veículos responsáveis pela transferência podem ser as mãos dos operadores por contacto das mãos com alimentos crus seguido do contacto com alimentos confeccionados, ou sempre que as mãos que contactem com diferentes alimentos não sejam lavadas quando se muda de tarefa (Baptista e Linhares 2005).

A higienização das instalações, equipamentos e utensílios é na sua maioria (80%) adequada. Dos inquiridos, 87% têm as instalações, equipamentos e utensílios em bom estado de conservação, já o *layout* e dimensões das instalações têm valores divisórios com 53% e 47% para adequado e não adequado, respetivamente (Gráfico 3).

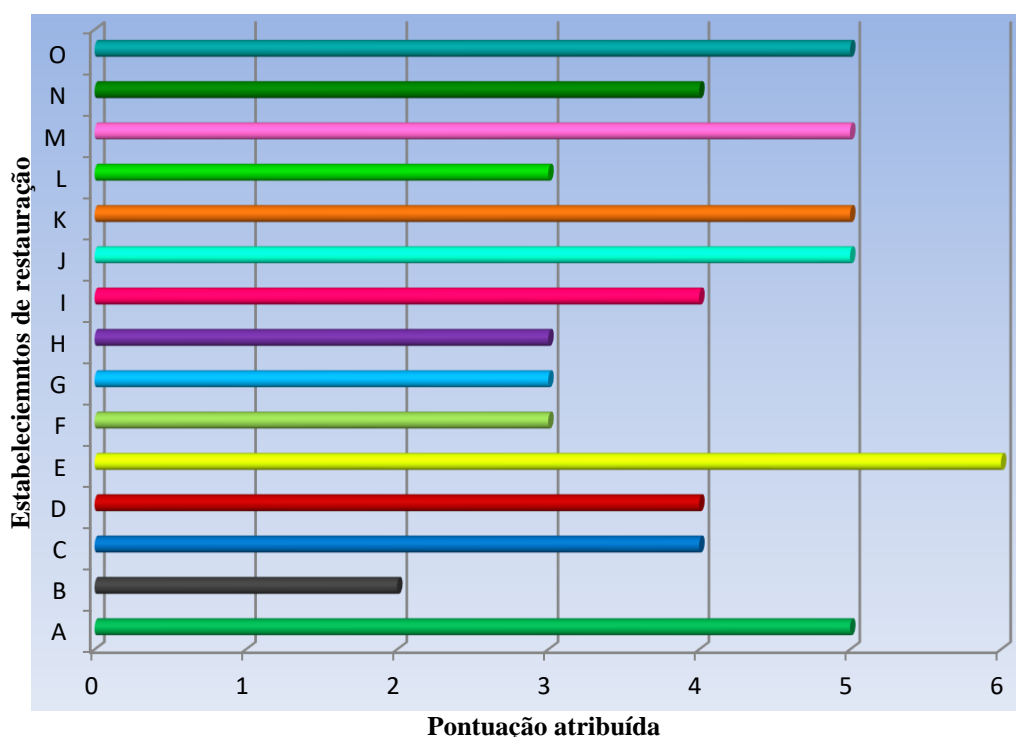
Gráfico 3 – Valores percentuais referentes às questões: existem zonas de preparação separadas por tipo de produto (15), zona de manipulação de confeccionados separada (16) e higiene das instalações, equipamentos e utensílios adequada (17).



A higienização das instalações, equipamentos e utensílios, deverá assegurar a eliminação das sujidades visíveis e não visíveis e a destruição de microrganismos patogénicos e de deterioração até níveis que não coloquem em causa a saúde do consumidor e a qualidade do produto (Noronha [date unknown]).

No Gráfico 4 estão representadas as pontuações totais para o ponto “instalações” verificada nos estabelecimentos de restauração. A pontuação máxima para este tópico é 6, o que corresponde a 6 questões em que são cumpridos todos os requisitos.

Gráfico 4 - Pontuação atribuída a cada estabelecimento de restauração referente às instalações.



1.4. Controlo de processos

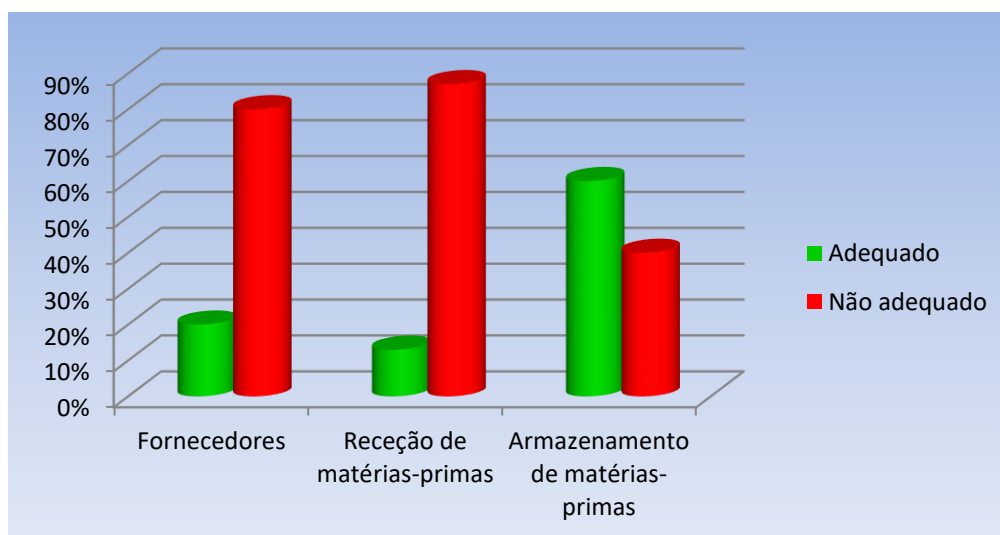
A conceção dos edifícios não deverá impor constrangimentos aos processos. O *layout* deve assegurar que o produto em curso de fabrico e o produto final não atravessem linhas de produção onde circule o produto ainda não processado (Noronha and Baptista 2003).

O controlo de processos é referente ao estabelecimento de procedimentos, parâmetros e respetiva monitorização para verificação do seu cumprimento. É relativo, por exemplo, a fornecedores, receção e armazenamento de matérias-primas, e aos processos de descongelação, confeção, arrefecimento e pós-confeção.

Na maioria dos inquiridos (67%) as matérias-primas são entregues no restaurante pelos fornecedores, nos restantes 33% são os funcionários responsáveis pela sua compra nas grandes superfícies. No que refere à existência de alguma metodologia de controlo de

fornecedores como análises, auditorias e certificados HACCP, apenas 20% apresentavam medidas de controlo de fornecedores contrastando com a maioria (80%) que não tinham. Dos estabelecimentos de restauração cujos fornecedores entregavam matérias-primas no estabelecimento, apenas 30% tinham metodologia de controlo de fornecedores. Quanto à definição de procedimentos e parâmetros de controlo de receção de matérias-primas e verificação do respetivo cumprimento, observou-se que apenas 13% dos restaurantes tinham um plano de controlo. Sempre que não exista entrada de serviço, os fornecimentos devem fazer-se fora dos períodos em que o estabelecimento esteja aberto ao público ou, não sendo possível, nos períodos de menor frequência (Decreto Regulamentar nº 20/2008). Por seu lado, na maior parte dos restaurantes (60%), verificou-se o cumprimento do critério de existência de procedimentos e parâmetros de controlo de armazenamento de matérias-primas e respetivo cumprimento (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Controlos referentes ao controlo de fornecedores, receção e armazenamento de matérias-primas.



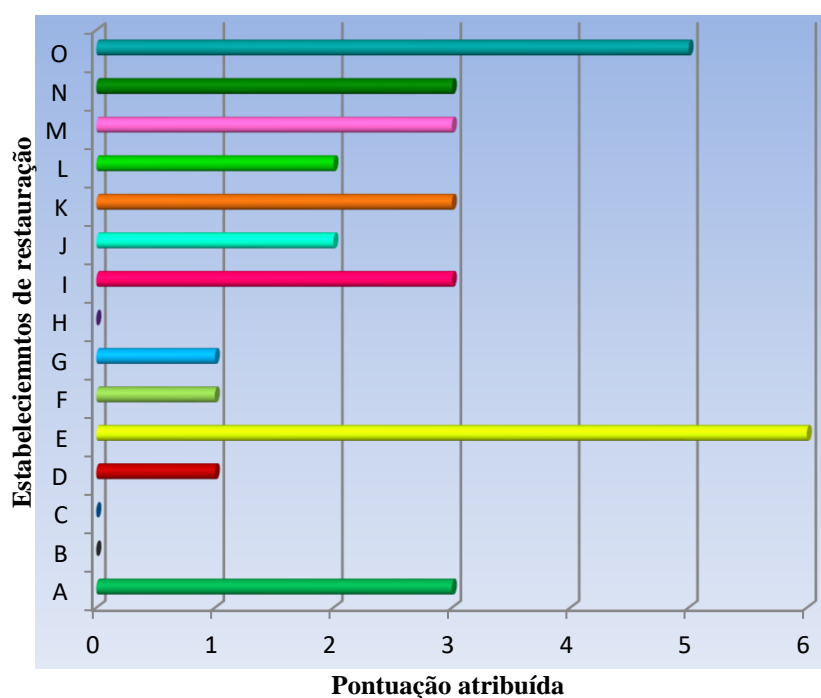
Para prevenir, reduzir ou eliminar a contaminação dos alimentos deve ser exercido controlo sobre as etapas pelas quais passam. Esse controlo é obtido se cumprirem os programas de pré-requisitos e um plano de autocontrolo, com correspondente monitorização e registo.

Os programas de pré-requisitos para o setor de restauração abrangem a localização da empresa, instalações e equipamentos, higiene do pessoal, serviços (como fornecimento de água, extração de vapores e remoção dos resíduos), limpeza, armazenagem, zonas de trabalho, controlo de pragas, controlo de fornecedores qualificados com garantia de qualidade e que permitam a rastreabilidade das matérias-primas, controlo à receção, gestão e registos (Bolton and Maunsell, 2004).

Quanto a procedimentos e parâmetros de controlo de confeção, a esmagadora maioria (93%) não tinha procedimentos estabelecidos, apenas um restaurante (7%) o tinha. Controlo dos óleos de fritura existia em 60% dos estabelecimentos. Nenhum dos restaurantes apresentava procedimentos e parâmetros de controlo de arrefecimento dos géneros alimentícios. Apenas 7% dos restaurantes tinham procedimentos e parâmetros de controlo de pós-confeção.

No Gráfico 6 estão representadas as pontuações totais referentes a cada questão verificada no estabelecimento de restauração. A pontuação máxima atribuída é 8, o que corresponde a 8 questões em que são cumpridos todos os requisitos.

Gráfico 6 – Classificações dos estabelecimentos de restauração relativas ao controlo de processos.



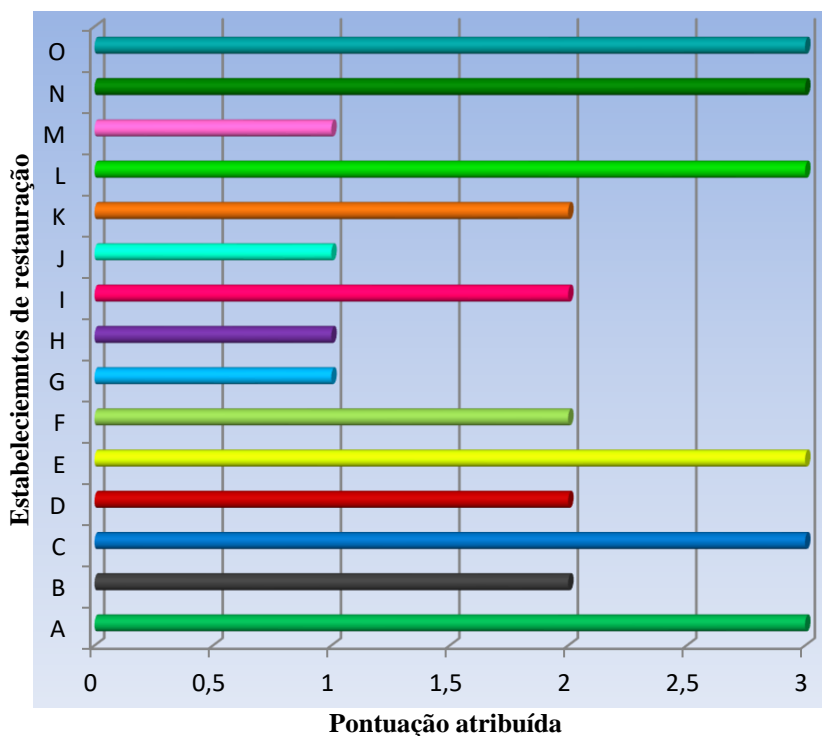
1.5. Higiene pessoal

Na análise dos potenciais perigos para a segurança dos alimentos com possibilidade de vir a ocorrer numa cozinha, devem identificar-se as potenciais fontes, que incluem as matérias-primas cruas, o ambiente, produtos de limpeza, pragas e pessoal. Além disso, qualquer etapa que possa contribuir para o aumento da contaminação ou da contaminação cruzada, deverá igualmente ser identificada (Bolton and Maunsell, 2004).

Em 60% dos estabelecimentos de restauração analisados, os funcionários possuíam formação em higiene e segurança dos alimentos. Na questão comportamentos e higiene do pessoal adequados, verificou-se que apenas em 13% dos restaurantes as regras de higiene pessoal são respeitadas, com ressalva para o facto de estes estabelecimentos não terem

funcionários com formação. O fardamento (EPI) era adequado e estava em bom estado de higiene em 60% dos estabelecimentos e na maioria (80%) a medicina no trabalho era atualizada (Gráfico 7). A pontuação máxima é de 4 para higiene pessoal.

Gráfico 7 – Classificações dos estabelecimentos de restauração relativas à higiene pessoal.



Apesar de mais de metade (60%) dos estabelecimentos terem funcionários com formação em higiene e segurança alimentar, verifica-se que em nenhum destes estabelecimentos foram observados comportamentos adequados. Esta discrepância entre a aquisição e aplicação dos conhecimentos, pode ser explicada por uma não compreensão da informação recebida ou mesmo por falta de motivação.

Por vezes, em situações de entrevista, os comportamentos relatados pelos funcionários são discrepantes dos comportamentos observados. Por outro lado, na presença de um observador, os funcionários podem alterar os seus comportamentos e manifestar comportamentos ou atitudes considerados desejáveis (Faria 2010).

A formação em higiene alimentar é uma exigência legal para as empresas do setor alimentar e assume um papel crucial para a garantia da segurança dos alimentos (Regulamento (CE) nº 852/2004). Assim, as pessoas envolvidas em operações alimentares que contactem direta ou indiretamente com os alimentos devem receber formação e/ou instruções em matéria de higiene alimentar adequadas às operações que irão executar. Todo o pessoal deve ter consciência do seu papel e da sua responsabilidade na proteção dos

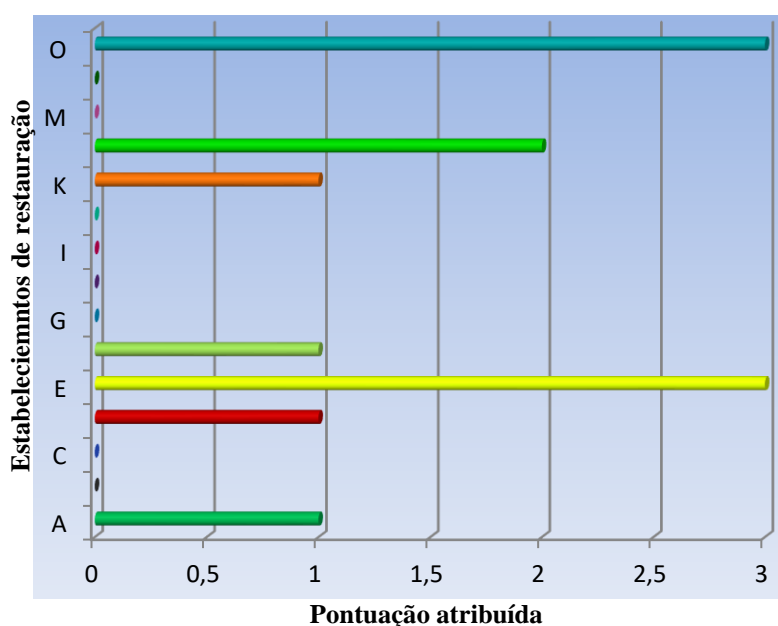
alimentos contra a contaminação ou deterioração, assumindo os comportamentos adequados durante o desempenho das suas tarefas (WHO and FAO 2003). Para que seja eficiente, a formação terá de conseguir alterar os comportamentos que mais frequentemente estão na origem das doenças de origem alimentar (Egan et al. 2007). Num estudo realizado por Clayton et al. 2002, 95% dos manipuladores de alimentos inquiridos tinham formação em higiene e segurança, no entanto, 63% admitia que por vezes não levava a cabo comportamentos adequados do ponto de vista da segurança dos alimentos. Isto vem também demonstrar que, por si só, o conhecimento é insuficiente para desencadear mudanças nas práticas de manipulação de alimentos e que são necessárias algumas medidas para motivar e gerar atitudes positivas nos manipuladores de alimentos (Egan et al. 2007).

1.6. HACCP

A existência de um plano de autocontrolo baseado nos princípios HACCP não é uma realidade em todos os estabelecimentos correspondendo a 53%, em oposição 47% dos estabelecimentos têm plano de autocontrolo baseado nos princípios HACCP. Dos 47% que têm um plano de autocontrolo baseado nos princípios HACCP em apenas 29% se verificou o seu cumprimento, os restantes 71% não cumpriam as premissas do plano de autocontrolo baseado nos princípios HACCP. Em 43% dos estabelecimentos os funcionários responsáveis pelo plano conheciam o seu conteúdo e 57% desconheciam os seus conteúdos.

A existência de um plano de autocontrolo baseado nos princípios HACCP não é uma realidade em todos os estabelecimentos verificados (Gráfico 8).

Gráfico 8 – Classificações dos estabelecimentos de restauração relativas ao plano de autocontrolo baseado nos princípios HACCP.



Assim, 53% dos estabelecimentos não têm plano de autocontrolo baseado nos princípios HACCP implementado, e dos 47% que têm um plano, só em 29% se verificou o seu cumprimento, enquanto nos restantes 71% não eram cumpridas as premissas do plano. Em entrevista, os funcionários responsáveis pelo plano conheciam o seu conteúdo em 43% dos estabelecimentos, e em 57% desconheciam-no (Gráfico 8). A pontuação máxima é de 3 para HACCP.

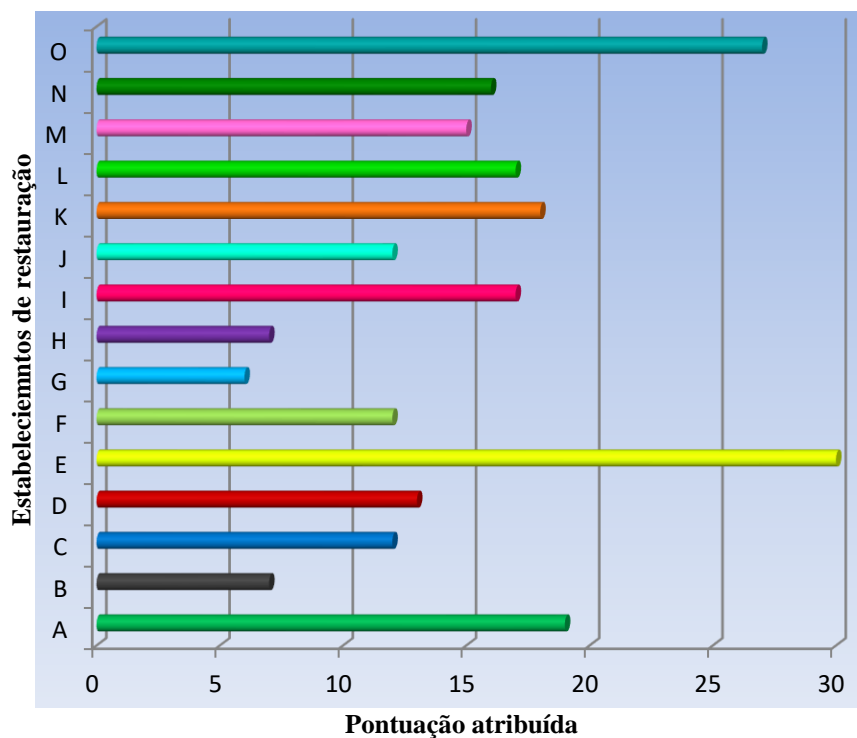
A prevenção das toxinfecções alimentares passa, fundamentalmente, pela implementação ao longo da cadeia alimentar de sistemas preventivos, como o HACCP. As empresas do setor alimentar devem, por conseguinte, aplicar os princípios do sistema HACCP, de modo a garantirem a segurança dos alimentos que produzem (Novais et al. 2004).

Os estabelecimentos de restauração destacam-se como locais de ocorrência de um maior número de incidentes de origem alimentar, não só porque o elevado número de refeições que preparam aumenta a probabilidade de contaminações cruzadas, como muitas preparações são efetuadas com antecedência, e o espaço de tempo que decorre entre a preparação e consumo permite a multiplicação microbiana.

A vigilância higio-sanitária efetuada nas unidades de restauração é a melhor medida preventiva relativamente às toxinfecções alimentares (Novais et al. 2004).

No Gráfico 9 está representada a pontuação global dos restaurantes.

Gráfico 9 – Pontuação global dos restaurantes.



1.7. Determinações microbiológicas

Foi avaliada a qualidade microbiológica dos alimentos prontos a consumir, produzidos pelos estabelecimentos de restauração aos quais foram aplicadas as listas de verificação previamente definidas. A Tabela 10 mostra os alimentos prontos a consumir (prato do dia) recolhidos por restaurante.

Tabela 10 – Estabelecimentos de restauração, classificação em Grupos e Subgrupos de acordo com INSA (2019) e correspondentes pratos do dia.

Amostra	Grupo e Subgrupo de alimentos	Prato do dia
A	2C	Açorda de gambas com coentros crus
B	2C	Pezinhos de porco com grão com coentros crus
C	2C	Bacalhau à Brás com salsa crua
D	2C	Açorda com pescada frita com coentros crus
E	2C	Salada de bacalhau com grão com salsa crua
F	1A	Carne de vaca estufada com arroz
G	2C	Bacalhau à Brás com salsa crua
H	1A	Filetes de pescada enrolada em bacon com arroz e puré de ervilha
I	1A	Strogonoff de porco com arroz
J	1A	Dobrada
K	1A	Dobrada com arroz
L	1A	Jardineira
M	1A	Arroz de coelho
N	1A	Dobrada com arroz
O	1A	Corvina grelhada com batata e arroz (eram os dois acompanhamentos)

O critério microbiológico é um critério que define a aceitabilidade de um produto, de um lote de géneros alimentícios ou de um processo, baseado na ausência ou na presença de microrganismos, ou no seu número, e/ou na quantidade das suas toxinas/metabolitos por unidade de massa, volume, área ou lote (Regulamento n.º 2073/2005).

Para determinar a qualidade microbiológica dos alimentos pode-se utilizar como parâmetros microrganismos indicadores de contaminação. O termo microrganismo indicador pode ser aplicado a qualquer grupo taxonómico, fisiológico ou ecológico de microrganismos, cuja presença ou ausência proporciona evidência indireta referente a uma característica particular do histórico da amostra (Schuh et al. 2015).

Microrganismos indicadores são grupos ou espécies de microrganismos que, quando presentes num alimento podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de microrganismos patogénicos ou sobre a deterioração potencial do alimento, além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção e armazenamento (Ferreira et al. 2014).

Os microrganismos indicadores podem ser utilizados para refletir a qualidade microbiológica dos alimentos em relação à vida de prateleira ou à segurança para o consumidor, neste caso, devido à presença de agentes patogénicos alimentares (Ferreira et

al. 2014). A maior aplicação dos microrganismos indicadores consiste na avaliação da qualidade global de um alimento e das condições de higiene durante o seu processamento.

A família *Enterobacteriaceae* representa um grupo de bactérias consideradas indicadores de higiene e, assim, usadas na monitorização da eficácia da implementação de pré-requisitos como BPF e de BPH (Cordier 2006). Permitem avaliar a eficiência da lavagem e da desinfecção mas também o estado higiénico de um género alimentício. A sua presença em alimentos que sofreram tratamento térmico significa normalmente que este foi inadequado ou que ocorreu uma contaminação após o processamento (Ray and Bhajjia 2008; INSA 2019).

Realizaram-se as contagens de microrganismos aeróbios a 30°C e de *Enterobacteriaceae*, e as pesquisas de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*.

Foram avaliadas 15 amostras. Numa abordagem prévia, as amostras A e B, foram avaliadas para *Enterobacteriaceae* e *Escherichia coli*. Ficou, depois, estabelecido realizar a análise de microrganismos aeróbios a 30°C e *Enterobacteriaceae* nas restantes 13 amostras. Os resultados das análises microbiológicas efetuadas aos pratos do dia encontram-se expressos na Tabela 11.

Tabela 11 – Resultados das determinações microbiológicas dos indicadores de higiene dos géneros alimentícios e classificação dos restaurantes.

Amostras	Pontuação total atribuída	Microrganismos aeróbios mesófilos a 30°C (log ufc/g)	<i>Enterobacteriaceae</i> (log ufc/g)	<i>Escherichia coli</i> (log ufc/g)
A	19	Não determinado	<1	<1
B	7	Não determinado	<1	<1
C	12	5,0	<1	
D	13	4,0	1,7	
E	30	6,5	5,5	
F	12	6,4	4,1	
G	6	6,4	4,5	
H	7	3,7	3,4	
I	17	3,5	2,5	
J	12	2,4	<1	
K	18	4,2	<1	
L	17	2	1,7	
M	15	<1	<1	
N	16	2,6	<1	
O	27	4,7	5,3	

Os valores das contagens de microrganismos aeróbios a 30°C, variaram entre a ausência de colônias (<1 log ufc/g) até um máximo de 6,5 log ufc/g. No que diz respeito à família *Enterobacteriaceae* os valores encontrados por contagem direta em placa variaram entre a ausência de colônias (<1 log ufc/g) e 5,5 log ufc/g. As contagens de *Escherichia coli* não revelaram desenvolvimento de colônias (<1 log ufc/g).

A Figura 2 mostra a imagem das placas de Petri com desenvolvimento superficial de colônias de aeróbios mesófilos (à esquerda) e de *Enterobacteriaceae* (à direita).

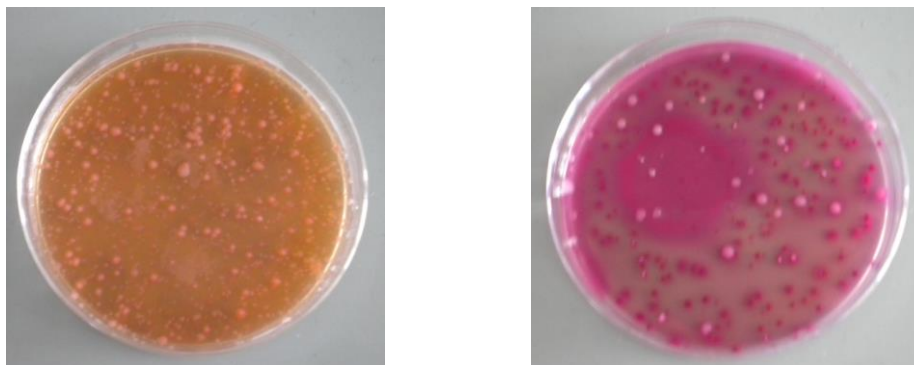


Figura 2 – A imagem da esquerda corresponde a uma placa de Petri com unidades formadoras de colônias de aeróbios mesófilos e a imagem da direita corresponde a uma placa de Petri com unidades formadoras de colônias de *Enterobacteriaceae*.

De acordo com os resultados obtidos para microrganismos aeróbios mesófilos a 30°C, as amostras analisadas foram divididas em dois grupos de acordo com a sua classificação nos Grupos e Subgrupos de alimentos propostos pelo INSA (2019). Quanto à qualidade microbiológica dos alimentos pertencentes ao Subgrupo 1A, 44% das amostras tinham um nível “satisfatório”, 22% tinham um nível “questionável” e 33% “não satisfatório”. Do Grupo 2C, para o mesmo grupo de microrganismos, 50% das amostras tinham um nível “satisfatório”, 50% apresentavam qualidade microbiológica “questionável” e nenhum apresentou qualidade “não satisfatório”.

Na contagem de microrganismos aeróbios a 30°C, não há diferenciação entre a microbiota naturalmente presente, os microrganismos deteriorantes e os microrganismos patogênicos, refletindo as condições a que o alimento foi sujeito (INSA 2019). Quando encontrados em altas concentrações nos produtos prontos a consumir, sugerem que a qualidade das matérias primas, as boas práticas de higiene e/ou fabrico, o processamento, ou temperatura de armazenamento e/ou transporte foram inadequadas (Oliveira et al. 2010; Silveira et al. 2019).

À medida que aumenta o tempo de armazenamento, aumenta também a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, o mesmo acontecendo se houver quebra de frio. Perante

níveis elevados de microrganismos aeróbios mesófilos, nomeadamente contagens $>10^6$ ufc/g, é importante identificar a flora predominante para interpretar adequadamente o significado desses teores (INSA 2019).

A maioria dos restaurantes verificados recebeu pontuações entre 10 e 20, fazendo parte deste grupo o C, D, F, I, J, K, L, M e N. Os resultados referentes às análises para microrganismos aeróbios a 30°C, das amostras pertencentes ao grupo 1A (F, I, J, K, L, M e N) as amostras J, L, M e N tiveram contagens microbiológicas com classificação “satisfatório”, a amostra I teve classificação “questionável” e as amostras F e K tiveram contagens “não satisfatório”. Das amostras C e D, pertencentes aos restaurantes do grupo 2C e com pontuações entre 10 e 20, ambas as amostras tiveram classificação “satisfatório”. As amostras G e H tiveram classificações pontuais de 6 e 7, respetivamente, e obtiveram classificação “questionável” para qualidade microbiológica do prato do dia.

A totalidade das amostras (n=15) foi analisada para *Enterobacteriaceae*. Dos alimentos pertencentes ao Grupo 1A, quanto à correspondente classificação para qualidade alimentar, 55% tiveram classificação “satisfatório”, 11% “questionável” e 33% “não satisfatório”. Dos alimentos pertencentes ao grupo 2C, 67% apresentaram qualidade microbiológica “satisfatório”, 17% “questionável”; e 17% teve classificação “não satisfatório” (Tabela 12).

Tabela 12 – Classificação das amostras quanto à contagem de microrganismos indicadores em placa (adaptado de INSA 2019).

Amostras e Grupo e Pontuação total	Subgrupo	atribuída	Classificação da qualidade microbiológica		
			Microrganismos aeróbios mesófilos a 30°C (ufc/g)	<i>Enterobacteriaceae</i> (ufc/g)	<i>Escherichia coli</i> (ufc/g)
A 2C		19	-	Satisfatório	Satisfatório
B 2C		7	-	Satisfatório	Satisfatório
C 2C		12	Satisfatório	Satisfatório	
D 2C		13	Satisfatório	Satisfatório	
E 2C		30	Questionável	Não satisfatório	
F 1A		12	Não satisfatório	Não satisfatório	
G 2C		6	Questionável	Questionável	
H 1A		7	Questionável	Não satisfatório	
I 1A		17	Questionável	Questionável	
J 1A		12	Satisfatório	Satisfatório	
K 1A		18	Não satisfatório	Satisfatório	
L 1A		17	Satisfatório	Satisfatório	
M 1A		15	Satisfatório	Satisfatório	
N 1A		16	Satisfatório	Satisfatório	
O 1A		27	Não satisfatório	Não satisfatório	

Os resultados das análises para *E. coli* foram “satisfatório” para ambos, ainda que na lista de verificação o restaurante A tenha a classificação de 19 valores enquanto o restaurante B tenha apenas 7 valores. Os critérios microbiológicos que envolvem a *Escherichia coli* são úteis quando é desejável determinar se houve contaminação fecal. Uma vez que este microrganismo vive durante pouco tempo fora do ambiente entérico, a sua presença nos alimentos indica contaminação recente (Ferreira et al. 2014).

Os estabelecimentos com pontuações entre 10 e 20 (A, C, D, F, I, J, K, L, M e N) obtiveram as três classificações de qualidade microbiológica. As amostras A, C e D, pertencentes ao Grupo 2C tiveram contagens em placa classificadas como “satisfatório”. As restantes amostras são incluídas no Grupo 1A, e as amostras J, K, L, M e N foram classificadas como “satisfatório”. A amostra I foi a única com atribuição “questionável” e a F teve “não satisfatório”. As amostras B, G e H tiveram atribuição de pontuação inferior a 10, respetivamente 7, 6 e 7, e a amostra B teve classificação “satisfatório”. A amostra G obteve contagens “questionável” e a H “não satisfatório” para *Enterobacteriaceae*.

Fang et al. 2003, realizaram um estudo sobre alimentos prontos a consumir nos quais os pontos de controlo críticos incluíam o controlo da temperatura e tempo de confeção. Os alimentos eram embalados em caixas, sob vácuo, e arrefecidos até $18\pm 2^{\circ}\text{C}$ em 5 min. Este método de arrefecimento rápido retarda o crescimento microbiano, e os autores mostram que se mantidos a 18°C , os alimentos têm validade de 20 horas. Das análises realizadas para microrganismos aeróbios mesófilos, 33,3% das amostras pertencentes ao Grupo 1A, tiveram contagens superiores a $>10^4$ (não satisfatório), para o Grupo 2C nenhuma das amostras mostrou contagens superiores $>10^8$. A segurança e qualidade microbiológica destes produtos devem ser prioritárias, uma vez que não recebem qualquer tratamento térmico entre a sua finalização e o seu consumo (Fang et al. 2003).

Quanto à deteção de microrganismos patogénicos, todas as amostras apresentaram ausência de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em 25 gramas. Ainda assim, na amostra L, na pesquisa de *Salmonella* spp., foram observadas colónias suspeitas nos meios de cultura seletivos Hektoen e XLD (Figura 3), nomeadamente colónias verdes com centro negro no primeiro, e colónias vermelhas, transparentes ou com halo vermelho no segundo (Holanda et al. 2017). Foi repicada uma colónia suspeita do meio XLD para meio TSI inclinado em tubo, com fundo direito e bisel.

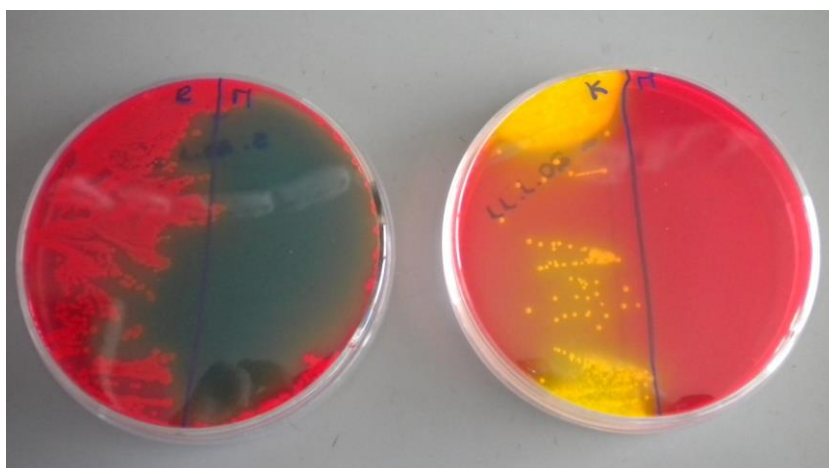


Figura 3 – A placa de Petri da esquerda corresponde a uma placa com ufc em meio Hektoen e a da direita com meio XLD. As amostras L e M foram semeadas, cada uma, numa hemi-placa.

O meio TSI, é um meio de identificação das bactérias da família *Enterobacteriaceae*. Permite detetar a fermentação dos hidratos de carbono e a produção de H_2S . A sementeira é realizada por picada no fundo do tubo e em estria na superfície inclinada do meio TSI. A Figura 4 mostra imagens de um tubo de ensaio com o meio TSI antes de ser semeado e após sementeira e incubação.



Figura 4 – Tubo de ensaio com meio TSI (à esquerda) e tubo com meio TSI após sementeira e incubação (à direita).

O tubo de TSI revela positividade - produção de gás (CO_2) no fundo do tubo, com fundo amarelo e o bisel vermelho, e a produção de H_2S é detetado pela cor negra. Posteriormente, faz-se a repicagem para meio de TSA o qual incuba a $37^\circ C$ durante 24 horas. Das colónias desenvolvidas realizaram-se testes bioquímicos para identificação da espécie

(API®20E), tendo-se identificado *Proteus mirabilis* (Holanda et al. 2017). A Figura 5 mostra a galeria API®20E com os resultados dos testes bioquímicos para identificação de espécie.



Figura 5 – Teste API®20E (BIOMÉRIEUX) com os resultados bioquímicos para a espécie *Proteus mirabilis*.

Na amostra N, a partir do tubo com 1 ml da suspensão inicial e meio de enriquecimento Frazer II, foi semeada com ansa, por estria, uma placa com meio de Oxford que incubou a 37°C durante 24 horas. Após incubação revelou colónias suspeitas de *Listeria monocytogenes*, colónias pequenas, escuras e rodeadas por halo escuro, devido à hidrólise de esculina. Para a confirmação, foram selecionadas colónias típicas para sementeira em estria numa placa de meio de triptona soja agar (TSA), a qual incubou a 30°C durante 24 a 48 horas. Após crescimento, as colónias no meio, são observadas por transiluminação de Henry, pela qual as colónias que apresentam uma luminescência azul, são consideradas suspeitas e deve ser efetuado o teste da catalase e o da oxidase. Na Figura 6 a imagem da esquerda mostra crescimento de colónias suspeitas de *Listeria monocytogenes* no meio Oxford, e a imagem da direita, colónias azuis no meio TSA.

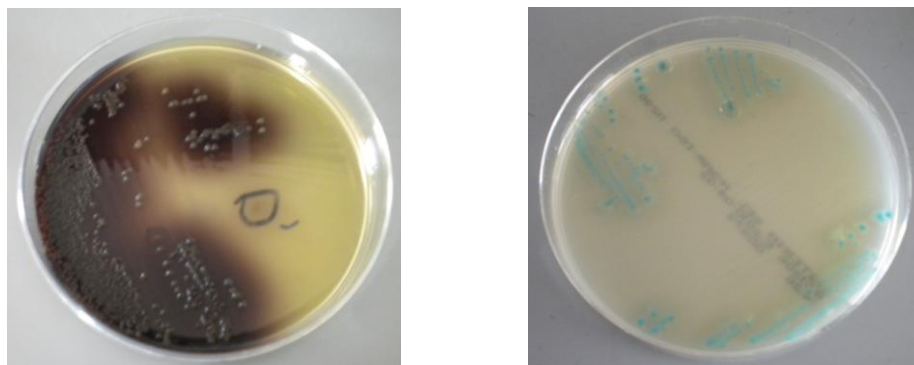


Figura 6 – A imagem da esquerda corresponde a uma placa de Petri com meio Oxford com colónias suspeitas de *L. monocytogenes*, e a imagem da direita corresponde a uma placa com meio TSA com colónias azuis características.

Se forem catalase positiva e oxidase negativa são realizadas provas bioquímicas de identificação de espécies, utilizando o sistema API®Listeria (BIOMÉRIEUX). No caso, foi identificada uma *Listeria seeligeri/welshimeri*. A Figura 7 mostra a galeria API®Listeria (BIOMÉRIEUX) com os resultados obtidos.



Figura 7 - API®Listeria (BIOMÉRIEUX) com os resultados das provas bioquímicas para a espécie *Listeria seeligeri/welshimeri*.

A presença de elevadas contagens de microrganismos aeróbios mesófilos não é sinónimo de presença de microrganismos patogénicos, assim como, contagens baixas não significam ausência de agentes patogénicos.

Na amostra L, proveniente de um estabelecimento de restauração com cotação de 17 valores, portanto acima da média (correspondente a 15,2 pontos), e com contagens para os dois microrganismos indicadores inferiores a 1×10^2 , houve a suspeita da presença de *Salmonella*, mas veio a verificar-se de facto a presença de um agente não patogénico *Proteus mirabilis*.

A amostra N pertencente ao estabelecimento de restauração que recebeu uma cotação de 16 valores, também acima da média, apresentava contagens para aeróbios mesófilos $4,3 \times 10^2$, considerada de qualidade microbiológica “satisfatório”. Houve suspeita da existência de *Listeria monocytogenes*, mas veio a confirmar-se a presença de *Listeria seeligeri/welshimeri*.

De entre as espécies pertencentes ao género *Listeria*, apenas uma é patogénica para o Homem, a *Listeria monocytogenes* (Gouin et al. 1994). As populações de *Listeria monocytogenes* nos alimentos são tipicamente baixas e requerem meios de enriquecimento seletivos para alcançarem níveis detetáveis. Múltiplas espécies de *Listeria* são rotineiramente encontradas no mesmo alimento, em ambientes de processamento alimentar (Dailey et al. 2015). Os microrganismos identificados, *Listeria seeligeri/welshimeri* e *Proteus mirabilis*, poderão ser indicadores de falhas na higienização das superfícies com que os alimentos contactam.

A avaliação em conjunto dos resultados analíticos dos 3 grupos de microrganismos indicadores e dos dois grupos de alimentos revelou que quanto à qualidade alimentar a maior parte dos estabelecimentos tiveram classificação “satisfatório”, e que por grupos se verifica que quer o grupo 1A, quer o grupo 2C a qualidade microbiológica dos alimentos é maioritariamente “satisfatório”.

Quanto às classificações atribuídas, a média de pontuações foi de 15,2. Dos estabelecimentos analisados, 7 tiveram pontuação acima da média e 6 tiveram pontuações inferiores. Seria de esperar que os estabelecimentos com pontuações mais elevadas tivessem amostras com qualidade microbiológica correspondente, mas tal só foi verificado para a amostra G, cuja pontuação foi a menor de todos, 6, e com análises do ponto de vista microbiológico “questionável”.

Os restaurantes E e O tiveram 30 e 27 de classificação, respetivamente, no entanto foi de onde provieram as amostras com pior qualidade microbiológica para ambos os microrganismos indicadores. Apesar de terem um plano de autocontrolo baseado nos princípios HACCP implementado, verifica-se que este não estará a ser cumprido. A avaliação das análises microbiológicas obtidas sugere a existência de vários problemas com matérias-primas contaminadas, no caso do restaurante E a utilização de ingredientes crus contaminados não higienizados, manipuladores que não higienizaram as mãos adequadamente, tempo e temperatura de confeção não adequada, arrefecimento à temperatura ambiente e contaminação pós-confeção. A higienização das superfícies de contacto era, nos dois estabelecimentos, adequada.

Os estabelecimentos com piores classificações foram os B, G e H, com as pontuações correspondentes 7, 6 e 7, respetivamente. O restaurante com menor pontuação (G) revelava qualidade microbiológica da amostra, “questionável” para aeróbios mesófilos e para *Enterobacteriaceae*. A amostra B, com 7 pontos de classificação, teve ainda assim qualidade microbiológica “satisfatório” para as duas análises de microrganismos. A amostra H teve pontuação 7, com qualidade “questionável” para aeróbios mesófilos e “não satisfatório” para *Enterobacteriaceae*.

As restantes 10 amostras tiveram classificações entre 10 e 20 pontos, com alimentos prontos a consumir com qualidade microbiológica classificada por “satisfatório”, “questionável” e “não satisfatório” para os dois grupos de microrganismos. Do total de amostras, 60% teve classificação “satisfatório” de qualidade microbiológica para *Enterobacteriaceae*, correspondendo ao maior número de amostras e, as duas classificações mais frequentes e com a mesma frequência para aeróbios mesófilos a 30°C foram “satisfatório” e “questionável”.

IV. Conclusão

O significado dos resultados apresentados é limitado, principalmente, pela dimensão da amostra disponível no estudo. Ainda assim é possível concluir, pela avaliação dos resultados, a enorme importância da higiene seja dos manipuladores, como das instalações, equipamentos, utensílios e superfícies com que contactam onde são manipulados e preparados os alimentos, tendo em vista a obtenção de alimentos de qualidade e seguros para o consumo humano.

Os manipuladores de alimentos são peças chave na produção e obtenção de alimentos de qualidade e inócuos do ponto de vista sanitário, como tal, devem ser detentores de uma higiene pessoal adequada para que o risco de contaminação seja mitigado.

A formação em higiene e segurança alimentar adquire grande relevância na medida em que através dela se pode alterar comportamentos e práticas inadequadas que podem estar na origem de doenças de origem alimentar. Para ser efetiva, a formação deve fornecer motivação aos funcionários para que manipulem corretamente os alimentos e tenham comportamentos adequados para que não ponham em causa a qualidade e segurança do género alimentício.

Os 15 estabelecimentos de restauração obtiveram uma média de classificação de 15,2 pontos num total de 34; 7 dos estabelecimentos tiveram cotação superior à média aritmética e 6 cotação inferior. Isto demonstra uma divisão quanto à aplicação na prática de BPF e sistemas de autocontrolo, verificando-se que a maior parte dos estabelecimentos ainda não tinham implementado um plano HACCP. Dos que tinham plano HACCP, verificou-se que a maioria não cumpria as premissas estabelecidas.

A parte referente a controlo de processos foi onde menos estabelecimentos tiveram respostas positivas de todos os grupos de perguntas, pelo facto de não estabelecerem procedimentos de controlo e monitorização de processos, que constituem pontos de controlo crítico.

Constatou-se que 60% dos estabelecimentos de restauração tinham contagens para *Enterobacteriaceae* indicadoras de boas condições de higiene das instalações, utilização de matérias-primas certificadas e controlo dos tratamentos térmicos.

A maior parte, 46%, dos restaurantes apresentaram amostras com contagens “satisfatório” para aeróbios mesófilos a 30°C, 31% “questionável” e 23% deram “não satisfatório”, o que pode ser explicado pela manutenção dos alimentos a temperaturas inapropriadas, por falta de controlo na temperatura de descongelamento dos alimentos ou desvios na temperatura de refrigeração estabelecida, matéria-prima contaminada, assim como, é indicativo de uma limpeza e desinfeção insuficiente.

Os estabelecimentos de restauração são locais prováveis de ocorrência de um maior número de incidentes, pelo fato de produzirem um número elevado de refeições com uma probabilidade elevada de contaminações cruzadas. A prevenção das toxinfecções alimentares passa, fundamentalmente, pela implementação ao longo da cadeia alimentar de sistemas preventivos de autocontrolo, como o HACCP.

V. Referências Bibliográficas

- André MV. 2017. Controlo da qualidade em microbiologia alimentar – estágio em laboratório com acreditação IPAC segundo a NP EN ISSO/IEC 17025. [dissertação de mestrado]. Viana do Castelo: Instituto Politécnico de Viana do Castelo.
- Antunes P, Peixe L. 2011. *Escherichia coli* em rebentos vegetais em França e na Alemanha. Riscos e Alimentos. 2:20-21.
- [APHORT] Associação Portuguesa de Hotelaria Restauração e Turismo. [Código de boas práticas de higiene e segurança alimentar – aplicação dos princípios de HACCP para a hotelaria e restauração [internet]. [accessed 2020 february 4]:[82 p.] <http://aphort.com>.
- Alves TMB. 2014. Bases para o planeamento de estratégias de educação sanitária alimentar em Moçambique (Confecção, Venda e Consumo de Alimentos no espaço Público). [dissertação de mestrado]. Almada: Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz.
- Baptista P, Antunes C. 2005. Higiene e segurança alimentar na restauração – Volume II – avançado. Forvisão - Consultoria em Formação Integrada, S.A..
- Baptista P, Linhares M. 2005. Higiene e segurança alimentar na restauração – Volume I – iniciação. Forvisão - Consultoria em Formação Integrada, S.A..
- Baptista P, Saraiva J. 2003. Higiene pessoal na indústria alimentar. Forvisão – Consultoria em Formação Integrada, Lda.
- Baptista P, Venâncio, A. 2003. Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos. Forvisão – Consultoria em Formação Integrada, Lda.
- Bolton DJ, Maunsell B. 2004. Guia para o controlo da segurança alimentar em restaurantes europeus [internet]. [accessed 2020 january 20]:[32 p.] <http://www.insarj.pt/site/resources/csan/Guia%20CSAN%202006.pdf>
- Carvalho ACFB, Cortez ALL, Salotti BM, Burguer KP, Vidal-Martins AMC. 2005. Presença de microrganismos mesófilos, psicrotróficos e coliformes em diferentes amostras de produtos avícolas. Arq Inst Biol. 72(3):303-307.
- Carvalho IT. 2010. Microbiologia dos alimentos [internet]. [accessed 2020 january 15]:[86 p.] <http://pronatec.ifpr.edu.br>
- Castro SARS. 2008. Boas práticas de higiene: um pilar para a produção de alimentos seguros [dissertação de Mestrado]. Lisboa: FMV – Universidade Técnica de Lisboa.
- Catão RMR, Ceballos BSO. 2001. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba (Brasil). Ciência e Tecnologia de Alimentos. 21(3):281-287.
- Chen Y. 2012. *Cronobacter* species, *Listeria monocytogenes*. In Food and Drug Administration, Bad Bug Book – Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins. 2th edition. Washington (DC): Center for Food Safety and Applied Nutrition. p. 50-53, 99-103.

- Chouman K, Ponsano EHG, Michelin AF. 2010. Qualidade microbiológica de alimentos servidos em restaurantes self-service. Rev Inst Adolfo Lutz. 69(2):261-266.
- Cordier JL. 2006. *Enterobacteriaceae*. ScienceDirect [internet]. [accessed 2020 january 20]:[1 p.] <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/enterobacteriaceae>.
- Correia JL. 2015. Avaliação microbiológica de refeições servidas em Cantina Universitária [dissertação de mestrado]. Coimbra: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.
- Dailey et al. 2015. Effect of *Listeria seeligeri* ou *Listeria welshimeri* on *Listeria monocytogenes* detection in and recovery from buffered *Listeria* enrichment broth. Food microbiol [internet]. [accessed 2020 february 4]:[19 p.] <http://www.researchgate.net/publication/269187647>.
- Decreto Regulamentar nº 20/2008 de 27 de novembro. Diário da República nº 231/2008 – Série I. Ministério da Economia e Inovação. Lisboa.
- Diakos A, Borges M. 2011. Prevalência de Salmonella nos produtos de origem animal no retalho em Portugal, no âmbito do controlo oficial. Riscos e Alimentos. 1:10-16.
- [EFSA and ECDC] European Food Safety Agency, European Centre for Disease Control. 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. The EFSA journal. John Wiley and Sons Ltd. Bruxelas: EFSA and ECDC.
- Egan MB, Raats MM, Grubb SM, Eves A, Lumbers ML, Dean MS, Adams MR. 2007. A review of food safety and food hygiene training studies in the commercial sector. Food control. 18:1180-1190.
- Fang TJ, Wei Q-K, Liao C-W, Hung M-J, Wang T-H. 2002. Microbiological quality of 18°C ready-to-eat food products sold in Taiwan. International Journal of Food Microbiology. 80:241-250.
- [FAO and WHO] Food and Agriculture Organization and World Health Organization. 2003. Codex Alimentarius: Código de práticas internacionais recomendadas – Princípios gerais de higiene. CAC/RCP-1969, Rev. 4-2003. Rome.: WHO/FAO.
- Faria MSL. 2010. Avaliação dos conceitos e procedimentos de limpeza e desinfecção em estabelecimentos alimentares [dissertação de mestrado]. Lisboa: FMV – Universidade Técnica de Lisboa.
- [FDA] Food and Drug Administration. 2012. Bad Bug Book – Foodborne Pathogenic, Microorganisms and Natural Toxins Handbook. 2th edition. Washington (DC): Center for Food Safety and Applied Nutrition.
- Feng P. 2012. *Escherichia coli* (ETEC, EPEC, EHEC, EIEC). In Food and Drug Administration, Bad Bug Book – Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins. 2th edition. Washington (DC): Center for Food Safety and Applied Nutrition. p. 69-81.
- Ferreira H, Lima H, Coelho T. 2014. Microrganismos indicadores em alimentos de origem animal [Pós-graduação]. Semiárido: Universidade Federal Rural do Semiárido.

- Flisch MV. 2016. Elaboração do plano de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) do processo de produção do queijo Reino [dissertação de mestrado]. Juiz de Fora: Universidade Federal de Juiz de Fora.
- Food Ingredients Brasil. 2011. Microorganismos causadores de doenças de origem alimentar. Universidade Federal de São Paulo (unifesp) [internet]. [accessed 2020 january 5]:[5 p.] <https://www.doccity.com/pt/microorganismos-causadores-de-doencas-de-origem-alimentar/4801661/>.
- [FQA and DCTA/ESAC] Formação Qualidade e Auditoria Agro-Alimentar, Departamento de Ciência e Tecnologia Alimentares da Escola Superior Agrária de Coimbra. 2002. HACCP – Manual de formação. Coimbra: FQA e DCTA/ESAC.
- Fresco JP. 2004. Ingeniería, autocontrol y auditoría de la higiene en la industria alimentaria. Mundi-Prensa Libros.
- [FSAI] Food Safety Authority of Ireland. 2005. The control and management of *Listeria monocytogenes* – Contamination of food. Dublin: FSAI.
- Geus JAM, Lima IA. 2000. Análise de coliformes totais e fecais: um comparativo entre técnicas oficiais VRBA e Petrifilm EC aplicados em uma indústria de carnes. 2º Encontro de Engenharia e Tecnologia dos campos gerais. [6 p.].
- Gouin E, Mengaud J, Cossart P. 1994. The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, an animal pathogen, e *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic species. American society for microbiology. 62(8):3550-3553.
- Hammack T. 2012. *Salmonella* species. In Food and Drug Administration, Bad Bug Book – Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins. 2th edition. Washington (DC): Center for Food Safety and Applied Nutrition. p. 12-16.
- Henriques BJM. 2014. Relação entre a higienização de manipuladores e superfícies e a contaminação do produto final em pequenas indústrias alimentares. [dissertação de mestrado]. Aveiro: Universidade de Aveiro.
- Holanda CMCX, Arimateia DS, Neto RM. 2017. Manual de bacteriologia e de enteroparasitos. Natal: Edufrn.
- [ICMSF] Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods. 2000. Microorganisms in foods 6: Microbial ecology of food commodities. 1st Edition. New York (NY): Springer.
- In Food Quality. [date unknown]. Os microrganismos e os alimentos [internet]. [accessed 2020 january 5]:[28 p.] <http://www.epralima.com>.
- [INSA] Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. 2019. Interpretação de resultados de ensaios microbiológicos. Valores guia. Lisboa: INSA.
- [INSA] Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. [date unknown]. Procedimento de colheita de amostras de refeições prontas a consumir para análise microbiológica. Lisboa: INSA.
- ISO 6579-1. 2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.. International Organization for Standardization. Genève.

- ISO 6887-2. 2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products. International Organization for Standardization. Gêneve.
- ISO 11290-1. 1996. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method. International Organization for Standardization. Gêneve.
- ISO 21528-2. 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* – Part 2: Colony-count method. International Organization for Standardization. Gêneve.
- Lima ENS, Mendes RA, Amaral AB, Carrijo KF. 2015. Análise microbiológica de saladas e água servidas em um restaurante universitário do Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brasil. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer. 11(22):3176-3186.
- Medeiros MGGA, Carvalho LR, Franco RM. 2017. Percepção sobre a higiene dos manipuladores de alimentos e perfil microbiológico em restaurante universitário. Ciência & Saúde Coletiva. 22(2):383-392.
- Monteiro SEA. 2016. Avaliação da qualidade microbiológica de saladas prontas para consumo comercializadas na região de Lisboa. [dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa.
- Moore G, Griffith C. 2002. A comparison of surface sampling methods for detecting coliforms on food contact surfaces. Food Microbiology. 19:65-73.
- Morgado ASJ. 2007. Validação de limites críticos do plano HACCP e avaliação de risco microbiológico num estabelecimento de restauração. [dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade Farmácia – Universidade de Lisboa.
- Neto AC, Rosa OO. 2014. Determinação de microrganismos indicadores de condições higiénicas sanitárias nas mãos de manipuladores de alimentos. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial. 8(1):1251-1261.
- Noronha J. [date unknown]. Manual de higienização da indústria alimentar [internet]. [accessed 2020 january 20]:[40 p.] http://www.esac.pt/noronha/manuais/Manual_Higienizacao_aesbuc.pt.pdf.
- Noronha J, Baptista P. 2003. Segurança alimentar em estabelecimentos agro-alimentares: projecto e construção. Forvisão – Consultoria em formação integrada, Lda.
- Novais MR, Santos MI, Correia CB. 2004. Alguns aspectos relacionados com a segurança alimentar no concelho de Lisboa. Revista Portuguesa de Saúde Pública. 22(1):37-41.
- NP 4396. 2002. Norma Portuguesa – Microbiologia Alimentar – Regras gerais para a contagem de *Escherichia coli*. Instituto Português da Qualidade, Ministério da Economia e Inovação. Lisboa.
- NP 4405. 2002. Norma Portuguesa – Microbiologia Alimentar – Regras gerais para a contagem de microrganismos, contagem de colónias a 30°C. Instituto Português da Qualidade, Ministério da Economia e Inovação. Lisboa.

- Oliveira ABA, Paula CMD, Capalonga R, Cardoso MRI, Tondo EC. 2010. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. *Revista HCPA*. 30(3):279-285.
- Oliveira MA, Takamura AE, Arias Vigoya AA, Araújo F. 2015. *Enterobacteriaceae*: bactérias intestinais de organismos aquáticos, um risco à saúde pública – revisão de literatura [internet]. [accessed 2020 january 15]:[20 p.] <http://www.researchgate.net/publication/304014102>.
- [OMS] Organização Mundial de Saúde. 2006. Cinco chaves para uma alimentação mais segura. Lisboa: OMS.
- Pereira FLH. 2009. Auditorias internas aos sistemas de Segurança Alimentar implementados em cantinas universitárias. [dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Pinto J, Neves R. 2010. Análise de riscos no processamento alimentar. Porto: Publidústria, edições técnicas.
- Portaria nº 1135/95 de 15 de setembro. Diário da República nº 214/95 – Série I. Ministérios da Agricultura, Saúde, do Ambiente e Recursos Naturais. Lisboa.
- Prescott LM, Harley JP, Klein DA. 2005. Microbiology. 6th edition. New York: McGraw-Hill.
- Ramaswamy V, Cresence VM, Rejitha JS, Lekshemi MU, Dharsana KS, Prasad SP, Vijila HM. 2007. *Listeria* – review of epidemiology and pathogenesis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 40:4-13.
- Ray B, Bhajania A. 2008. Fundamental food microbiology. 4th edition. London: CRC Press.
- Regulamento (CE) nº 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de abril. *Jornal Oficial da União Europeia* L 226/3.
- Regulamento (CE) nº 2073/2005 da Comissão de 15 de Novembro. *Jornal Oficial da União Europeia* L 338/1.
- Roberts CA. 2001. The Food Safety information handbook. Westport: Oryx Press.
- Santos IM, Alberty AR. 2011. *Listeria monocytogenes* em produtos hortofrutícolas prontos para consumo. *Riscos e alimentos*. 2:23-25.
- Schuh J, Ribeiros M, Ferenz M, Mattiello CA, Thaler Neto A, Millezi A, Semmelmann C, Da Silveira SM. 2015. Enumeração de microrganismos indicadores da qualidade higiênico-sanitária em queijo colonial. Mostra Nacional de Iniciação Científica e Tecnológica Interdisciplinar [internet]. [accessed 2020 february 8]:[12 p] <http://eventos.ifc.edu.br/wp-content/uploads/sites/5/2015/10/ENUMERA%C3%87%C3%83O-DE-MICRORGANISMOS-INDICADORES-DA-QUALIDADE-HIGI%C3%8ANICO-SANIT%C3%81RIA-EM-QUEIJO-COLONIAL.pdf>
- Silveira DR, Kaefer K, Porto RC, Lima HG, Timm CD, Cereser ND. 2019. Qualidade microbiológica de produtos de origem animal encaminhados para alimentação escolar. *Ciência animal brasileira*. 20:1-8.

- Souza LC, Iaria ST, Paim GV, Lopes CAM. 1983. Bactérias coliformes totais e coliformes de origem fecal em águas usadas na dessedentação de animais. Revista de saúde pública. 17:112-22.
- Veiga A, Lopes A, Carrilho E, Silva L, Dias MB, Seabra MJ, Borges M, Fernandes P, Nunes S. 2009. Perfil de risco dos principais alimentos consumidos em Portugal [internet]. [accessed 2020 january 3]:[330 p.] <http://www.asae.gov.pt/ficheiros-externos-outros/perfil-de-risco-dos-principais-alimentos-consumidos-em-portugal-pdf.aspx>.
- Viegas SJ. 2010. Alterações do estado de Saúde associados à alimentação – contaminação microbiológica dos alimentos [internet]. [accessed 2020 january 3]:[42 p.] <http://www2.insa.pt/sites/INSA/Portugues/Publicacoes/Outros/Paginas/AlteracoesSaudeAlimentacao.aspx>.
- Viegas SJ. 2014. Segurança Alimentar: Guia de boas práticas do consumidor. Lisboa: INSA.
- Welshimer HJ. 1968. Isolation of *Listeria monocytogenes* from vegetation. Journal of bacteriology. 95(2):300-303.